

**Universita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie



Michaela Balogová

Aristolochové kyseliny jako induktory exprese  
mRNA cytochromů P450

Aristolochic acids as inducers of mRNA of  
cytochromes P450

Školitelka: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2017

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a že jsem všechny prameny řádně citovala.

V Praze, dne:

Podpis:

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za pomoc při psaní bakalářské práce, trpělivost a vedením k samostatnosti.

Velké díky patří také RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D., která mě naučila laboratorním metodám od izolace RNA po stanovení genové exprese. Paní doktorka Dračínská byla velice trpělivá při zodpovídání otázek týkajících se vlastní práce v laboratoři a vyhodnocení zjištěných dat.

*Práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (17-12816S).*

## Abstrakt

Aristolochové kyseliny (AA) jsou alkaloidy obsažené v rostlinách čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*). Již od starověku jsou rostliny obsahující AA pro své protizánětlivé účinky užívány k léčení v tradiční čínské medicíně. Nicméně v minulém století byly objeveny účinky zcela protichůdné, a to mutagenní a karcinogenní. Dnes jsou AA klasifikovány jako prokazatelné lidské karcinogeny se silnými nefrotoxickými vlastnostmi. Hlavními složkami přírodní směsi těchto alkaloidů jsou aristolochová kyselina I (AAI) a aristolochová kyselina II (AAII). Aristolochové kyseliny způsobují dva typy nefropatií: nefropatii vyvolanou aristolochovými kyselinami (*Aristolochic Acid Nephropathy, AAN*), dříve známou jako nefropatii vyvolanou čínskými bylinami (*Chinese Herbs Nephropathy, CHN*), a Balkánskou endemickou nefropatii (*Balkan Endemic Nephropathy, BEN*). Obě onemocnění jsou úzce spojena se vznikem malignací v urotheliální tkáni, vyvolané karcinogenním působením AA. Pozoruhodnou skutečností je fakt, že po expozici AA nedochází k manifestaci malignací zdaleka u všech pacientů. To je pravděpodobně dáno jak rozdílnou interindividuální vnímavostí jedinců k AA, tak odlišnou aktivitou enzymů podílejících se na jejich biotransformaci. Právě detailní znalost těchto enzymů nám umožní objasnit rozdíly v průběhu onemocnění AAN a BEN. AAI může být v organismu oxidačně detoxifikována a redukčně aktivována. Redukční aktivace AAI zahrnuje tvorbu kovalentních aduktů AA s DNA, v jejichž důsledku vznikají transversní mutace  $AT \rightarrow TA$  v tumorovém supresorovém genu TP53. Oxidačně detoxifikována je AAI na 8 - hydroxyaristolochovou kyselinu (AAIa) cytochromy P450 (CYP) podrodiny 1A a 2C. Prvním cílem této bakalářské práce bylo sledování ovlivnění genové exprese biotransformačních enzymů CYP1A1, CYP1A2, CYP2C11 a jejich reductasy (NADPH:CYP reductasy, POR) vlastními studovanými látkami

AAI a AAI. V experimentech byli užiti potkani premedikovaní AAI, AAI a jejich směsí, jako kontrola pak sloužili potkani, kteří nebyli vystaveni žádné z výše zmíněných látek. Z jater, ledvin a plic těchto zvířat byla izolována RNA a pomocí metody RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) byly analysovány expresní hladiny mRNA studovaných enzymů. Druhým cílem bakalářské práce bylo studium oxidační metabolické cesty AAI. Jelikož je AAI oxidována na metabolit AAIA, byla za využití metody RP-HPLC (*Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) sledována právě AAIA a posléze bylo vyhodnoceno množství vzniklé AAIA.

## Abstract

Aristolochic acids (AA) are herbal drugs present in *Aristolochiaceae* family. Since antiquity, plants containing AA have been used, thanks to its anti-inflammatory effects, as a cure within traditional Chinese medicine. However, in the last century scientists have identified their completely different effects as effects mutagenic and carcinogenic. Nowadays, AA are classified as carcinogenic for humans, and as the compounds with strong nephrotoxic properties. The major compounds of natural mixture are Aristolochic acid I (AAI) and Aristolochic acid II (AAII). AA has been shown to be the cause of two types of nephropathy: Aristolochic Acid Nephropathy (AAN), formerly called Chinese Herbs Nephropathy (CHN), and Balkan Endemic Nephropathy (BEN). Both diseases are closely associated with malignant transformations in urothelial tissue caused by AA. Interestingly, not all of the patients, who have been exposed to AA, seem to develop the malignancy. The differences might be explained by interindividual susceptibility to AA and activities of biotransformation enzymes. Detailed studying of those enzymes allows us to investigate difference in progression of disease AAN and BEN. In organisms, AA can be oxidatively detoxified or reductively activated. Reductive activation of AAI includes formation of covalent adducts of activated AA with DNA resulting in transverse mutation AT -> TA in a tumour suppressor gene TP53. AAI is oxidatively detoxified to 8-hydroxyaristolochic acid (AAIa) by a reaction catalysed by cytochrome P450 (CYP) of 1A and 2C subfamilies. The first aim of the bachelor thesis was to study the influence of the own compounds causing AAN and BEN (AAI and AAI) on gene expression of the biotransformation of enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP2C11 and its reductase (NADPH:CYP reductase, POR). Wistar rats were exposed to AAI, AAI and to their mixture and rats which received none of mentioned substances were used as a control. RNA was isolated, and

levels of mRNA expression of studied enzymes were analyzed by RT-PCR (*Real Time Polymerase Chain Reaction*). The second aim of the thesis was to study oxidative metabolism of AAI. Since AAI is detoxified to AA1a, technique of RP-HPLC (*Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) was performed to detect AA1a and to subsequently evaluate the amount of formed AA1a.

# Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	5
Obsah.....	7
Seznam zkratek.....	9
1. Úvod.....	11
1.1. Aristolochové kyseliny a jejich výskyt.....	11
1.2. Tradiční čínská medicína.....	12
1.3. Onemocnění vyvolaná aristolochovými kyselinami.....	16
1.3.1 Nefropathie vyvolaná aristolochovými kyselinami.....	19
1.3.2 Balkánská endemická nefropathie.....	25
1.4. Metabolismus aristolochových kyselin.....	26
1.4.1. Detoxikace aristolochových kyselin.....	28
1.4.2 Bioaktivace aristolochových kyselin.....	32
1.4.3. Enzymy detoxikačního (oxidačního) metabolismu.....	35
1.4.4. Enzymy aktivačního (redukčního) metabolismu.....	36
1.4.5. Role genetického polymorfismu v metabolismu aristolochových kyselin.....	37
2. Cíl bakalářské práce.....	38
3. Materiál a metody.....	38
3.1. Použití materiál a chemikálie.....	38
3.1.1. Chemikálie.....	39
3.1.2. Přístroje.....	41
3.2. Metody.....	41
3.2.1. Premedikace laboratorního potkana.....	41
3.2.2. Isolace mRNA z jater a ledvin potkana.....	43
3.2.3. UV-VIS spektrofotometrie mRNA izolované z jater a ledvin potkana.....	43



3.2.4. Synthesa cDNA z mRNA izolované z jater a ledvin potkana.....	46
3.2.5. Stanovení exprese mRNA analysovaných enzymů.....	47
3.2.6. Oxidaci AAI potkaními mikrosomy.....	48
3.2.7. Vysokotlaká (vysokoúčinná) kapalinová chromatografie AAI a jejího metabolitu.....	49
4. Výsledky a diskuse.....	49
4.1. Isolace mRNA z jater a ledvin potkana .....	49
4. 2. UV-VIS spektrofotometrie a synthesa cDNA z mRNA izolované z jater a ledvin potkana.....	50
4.3. Stanovení exprese mRNA enzymů analysovaných enzymů .....	53
4.4. Oxidace AAI potkaními mikrosomy a vysokotlaká (vysokoúčinná) chromatografie AAI a jejího metabolitu.....	61
5. Závěr.....	64
Seznam použité literatury.....	66

## Seznam zkratek

AA	aristolochová kyselina
AAI	aristolochová kyselina I
AAII	aristolochová kyselina II
AAN	nefropathie vyvolaná aristolochovými kyselinami (z angl. „ <i>Aristolochic acid nephropathy</i> “)
AlacI	aristolaktam I
BEN	Balkánská endemická nefropathie (z angl. „ <i>Balkan endemic nephropathy</i> “)
COX-1	prostaglandin H-synthasa 1 (cyklooxygenasa) (z angl.: „ <i>Cyklooxygenase</i> “)
CYP	cytochrom P450
dA-AAI	7-(deoxyadenosin-N <sup>6</sup> -yl)aristolaktam I
dA-AAII	7-(deoxyadenosin-N <sup>6</sup> -yl)aristolaktam II
dG-AAI	7-(deoxyguanosin-N <sup>2</sup> -7-(deoxyadenosin-N <sup>6</sup> -yl)aristolaktam I -yl)aristolaktam I
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (z angl. „ <i>European food safety authority</i> “)
CHN	nefropathie vyvolaná čínskými bylinami (z angl. „ <i>Chinese herb nephropathy</i> “)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (z angl. „ <i>International agency for research on cancer</i> “)
MFO	systém oxidas/oxygenas se smíšenou funkcí (z angl. „ <i>Mixed function oxidase/oxygenase system</i> “)
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)

NADPH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (redukována forma)
NADPG-GS	NADPH-generující systém
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa)
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky (z angl. „ <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i> “)
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (z angl. „ <i>Reactive oxygen species</i> “)
OTA	ochratoxin A
RP-HPLC	vysokotlaká (vysokoúčinná) kapalinová chromatografie s reversní fází (z angl. „ <i>Reversed-phase high-performance liquid chromatography</i> “)
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězcová reakce (z angl. „ <i>Real time polymerase chain reaction</i> “)
UUC	urotheliální karcinom (z angl. „ <i>Upper urothelial carcinoma</i> “)
UV	ultrafialové záření

# 1. Úvod

## 1.1. Aristolochové kyseliny a jejich výskyt

Aristolochové kyseliny (AA) jsou přírodní látky obsažené v rostlinách čeledi podražcovitých (*Aristolochiaceae*). Tato čeleď čítá asi 600 druhů spadajících do 8 rodů<sup>1</sup> a systematicky ji lze zařadit mezi krytosemenné rostliny (*Magnoliophyta*), do třídy dvouděložných (*Magnoliopsida*) a řádu pepřotvarých (*Piperales*)<sup>2</sup>. Největším rodem *Aristolochiaceae* je *Aristolochia*, do které patří až 500 rostlinných druhů<sup>1</sup>. *Aristolochia* jsou popínavé vytrvalé byliny a dřeviny<sup>3</sup> široce rozšířené v tropickém, subtropickém a mírném pásu<sup>4</sup>. Můžeme je nalézt v Asii, Africe, Severní a Jižní Americe a Austrálii, přičemž jejich nejhojnější zastoupení připadá na tropický a subtropický podnebný pás Asie. Obývají ovšem i v chladnější oblasti jako je Kanada, Skandinávie nebo sever Japonska<sup>4</sup>.

Několik se vyskytuje v mírném pásu Evropy (viz Obr. 1, str. 12), mezi něž se řadí např. podražec křovistní (*Aristolochia clematitis*), jakožto jediný zástupce rodu *Aristolochia* rostoucí na území České republiky<sup>5</sup>.



*Obr. 1: Rozšíření rostlinného rodu Aristolochia ve světě. Rostliny Aristolochia se vyskytují v tropickém, subtropickém a mírném pásu, přičemž nejhojněji jsou zastoupeny v tropickém a subtropickém pásu Asie (žlutě). Převzato a upraveno<sup>1</sup>.*

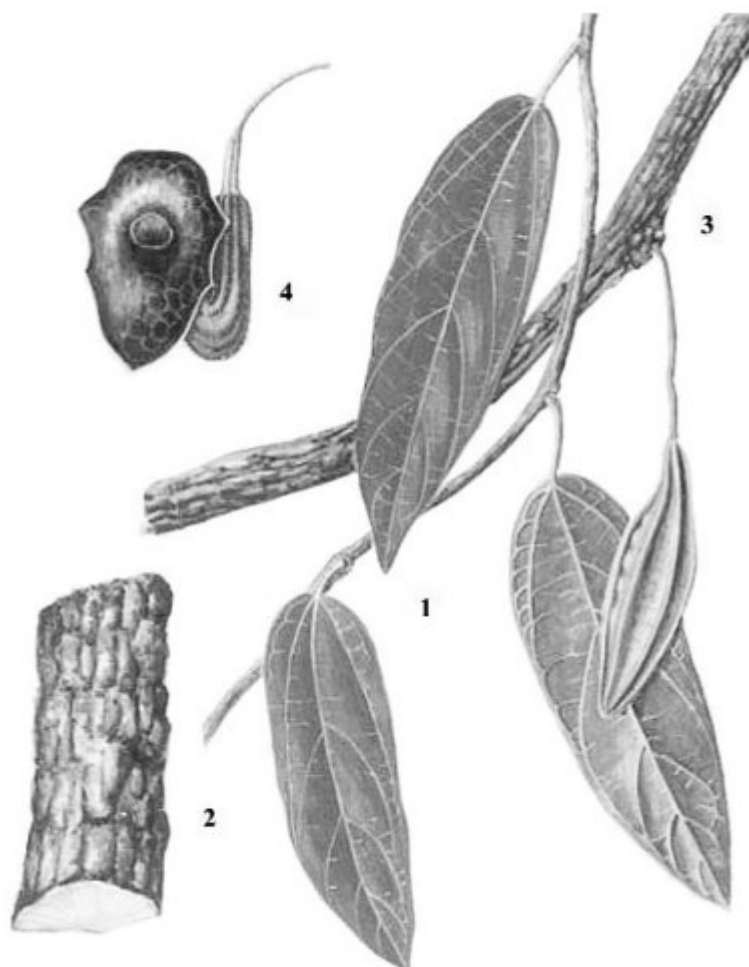
## 1.2. Tradiční čínská medicína

Již od starověku využívala tradiční čínská medicína rostliny čeledi podražcovitých k léčení. Léčivé části (stonky, kořeny či plody) každé rostliny nesou odlišná čínská pojmenování, přičemž mnohé druhy *Aristolochia* jsou snadno zaměnitelné s jinými běžně užívanými rostlinnými extrakty<sup>6</sup>. Např. název *Fang Ji* lze použít pro kořeny *Aristolochia fanghi*, *Stephania tetrandra* nebo zástupce druhu *Cocculus*. Podobně *Mu Tong* označuje *Aristolochia mashuriensis* a zároveň určité druhy *Clemantis* či *Akebia* (viz Tab. 1, str. 13)<sup>7</sup>.

*Tab. 1: Srovnání latinských a čínských názvů zástupců Aristolochia s odpovídající částí rostliny. Léčivé části rostliny či celá rostlina různých druhů zástupců rodu Aristolochia nesou v čínštině shodné názvy, pod kterými jsou využívány k léčbě v tradiční čínské medicíně. Převzato a upraveno<sup>7</sup>.*

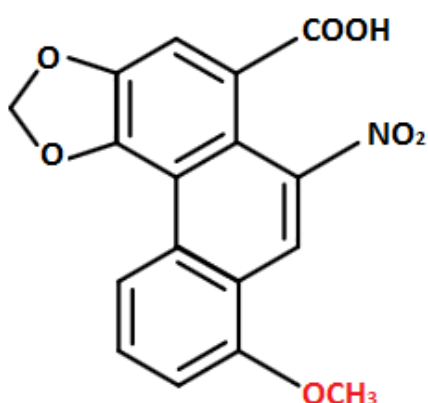
<b>Zástupci <i>Aristolochia</i></b>		
<b>Latinský název</b>	<b>Čínský název</b>	<b>Část rostliny</b>
<i>Aristolochia fanghi</i>	Guang Fang Ji	kořen
<i>Aristolochia manshuriensis</i>	Guang Mu Tong	stonek
<i>Aristolochia contorta</i>	Ma Dou Ling	plod
<i>Aristolochia debilis</i>	Ma Dou Ling	plod
<i>Aristolochia contorta</i>	Tian Xian Teng	celá rostlina
<i>Aristolochia debilis</i>	Tian Xian Teng	celá rostlina
<i>Aristolochia debilis</i>	Qing Mu Xiang	kořen

Několik zástupců *Aristolochia*, jmenovitě *A. contorta*, *A. debilis*, *A. fanghi* a *A. manshuriensis*, jsou intensivně využívány v tradiční čínské medicíně jako protizánětlivá léčiva, diuretika a k léčbě otoků<sup>7</sup>. Rostlinné části *A. contorta* a *A. debilis* slouží k různým terapeutickým účelům. Jejich plody se využívají k léčbě hemeroidů, kašle a astmatu. Stonky či listy se používají k utlumení bolesti v nadbřišku, bolesti kloubů a k odstranění otoků. Krom toho se kořeny *A. debilis* léčí závratě, bolesti břicha a vředy, či dokonce hadí uštknutí. *A. clematidis* stimuluje imunitní systém a užívá se k léčbě alergických reakcí vzniklých v důsledku gastrointestinální a žlučnickové koliky. Využití *A. clematidis* v lidové medicíně je však mnohem rozsáhlejší. V homeopatii ji slouží k léčbě gynekologických poruch a utlumení klimatického přechodu. Navíc léčí i rány a vředy, a proto se používá především při chirurgických zákrocích. *A. manshuriensis* se obvykle předepisuje protizánětlivé diuretikum na akutní infekci močových cest. *A. fanghi* je pouze předepisována jako komplexní směs léčiv spolu s dalšími rostlinami. Takováto směs pak slouží především jako diuretikum na léčbu otoků a antipyretikum či analgetikum (viz Obr. 2, str. 14)<sup>8</sup>.

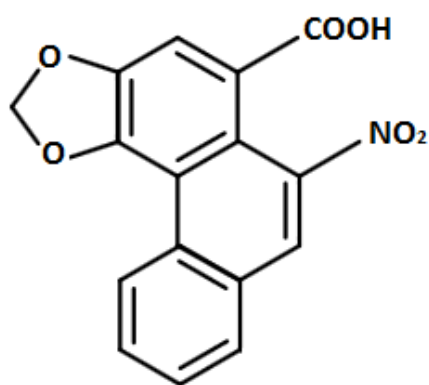


*Obr. 2: Nákres Aristolochia fanghi. A. fanghi je běžně předepisovaná v tradiční čínské medicíně jako komplexní směs léčiv proti otokům, bolestem a horečkám. 1 – list, 2 – větev, 3 – plod, 4 – květ. Převzato a upraveno<sup>9</sup>.*

Většina zástupců *Aristolochia* obsahuje směs toxických aristolochových kyselin (AA). Rostlinný extrakt je tvořen asi 30 aristolochovými kyselinami, 20 aristolaktamy a dalšími deriváty AA, nicméně hlavní složkou této přírodně se vyskytující směsi je aristolochová kyselina I (AAI) - 8-methoxy-6-nitro-fenanthro-3,4-d)-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina - a aristolochová kyselina II (AAII) - 6-nitro-fenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-karboxylová kyselina (viz Obr. 3, str. 15)<sup>9</sup>.



Aristolochová kyselina I



Aristolochová kyselina II

Obr. 3: **Struktura aristolochových kyselin.** Chemicky se jedná o nitrofenanthrenové karboxylové kyseliny. Aristolochová kyselina I má na uhlíku v poloze 8 methoxyskupinu, kdežto aristolochová kyselina II nemá uhlík v poloze 8 substituovaný.

Poměr AAI a AAI v rostlině závisí na daném druhu. Mezi zástupce obsahující větší množství AAI než AAI patří např. *Aristolochia fanghi*, naopak je tomu např. u druhu *Aristolochia contorta*<sup>9</sup>. Jak již bylo uvedeno výše, AA mají významné protizánětlivé účinky, právě díky čemuž byly již od starověku intensivně užívány v léčitelství, především tedy v čínské lidové medicíně. Dnes jsou však považovány za toxické látky s mutagenními a karcinogenními účinky<sup>10,11</sup>. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) je klasifikovala jako karcinogenní pro člověka. Krom toho jsou to silné nefrotoxiny<sup>12</sup> a cytotoxiny<sup>13</sup>. Prokazatelně způsobují onemocnění označována jako nefropatie vyvolaná aristolochovými kyselinami (*Aristolochic Acid Nephropathy, AAN*)<sup>14</sup> a Balkánskou endemickou nefropatií (*Balkan Endemic Nephropathy, BEN*)<sup>15,16</sup>.



### 1.3. Onemocnění vyvolaná aristolochovými kyselinami

Jak již bylo zmíněno, byly rostliny *Aristolochia* odedávna využívány v lidové medicíně, především tedy v tradiční čínské medicíně jako protizánětlivá léčiva. V předchozích letech byly však zaznamenány účinky zcela protichůdné, a to nefrotoxické, cytotoxické a především karcinogenní. Po desítkách let bádání byly AA, jako součást extraktu rostlinných druhů *Aristolochia*, prokázány jako původci dvou závažných nefropathií – nefropathie vyvolané aristolochovými kyselinami (AAN) a Balkánské endemické nefropathie (BEN). Obě tato onemocnění spolu sdílí řadu klinických a histologických aspektů, odlišují se především ve vlastním průběhu vývoje těchto chorob. AAN je nemoc daleko agresivnější, s rychlým nástupem záhy resultujícím ve vývoj nádorů močových cest (UUC), naopak BEN je charakteristická svým pomalým vývojem.

#### 1.3.1. Nefropathie vyvolaná aristolochovými kyselinami

V 90. letech 20. století popsal Vanherweghem et al. případy progresivní intersticiální renální fibrosy u dvou mladých žen. Mezi lety 1991 a 1992 byla sedmi dalším ženám ve věku pod 50 let diagnostikována terminální či preterminální fáze těžkého ledvinného selhání. Biopsie ledvinové tkáně ledvin pacientek odhalila, v 8 z 9 případů, rozsáhlou intersticiální fibrosu. Dvěma ženám byla již zpočátku diagnostikována terminální fáze ledvinného selhání a byla jim okamžitě ordinována léčba dialysou, zatímco u sedmi dalších žen došlo k postupnému, ale výraznému zhoršení renálních funkcí v průběhu tří měsíců. Všechny tyto ženy podstoupily kúru pro redukci tělesné hmotnosti na stejné klinice v Belgii.

Klinika se specializovala na redukci tělesné hmotnosti po 15 let bez sebemenších problémů. V květnu 1990, byla léčba pozměněna. Součástí kúry se staly dvě čínské byliny *Stephania tetrandra* a *Magnolia officinalis*<sup>16</sup>. Chemická analyza čínských bylinných extraktů dovezených do Belgie prokázala přítomnost směsi AAI a AAI a tedy záměnu rostliny *Stephania tetrandra* za jinou čínskou bylinu, a to nefrotoxickou *Aristolochia Fang Ji*<sup>17</sup>. Jak již bylo uvedeno, název *Fang Ji* lze v čínské lidové medicíně použít pro rostlinné druhy *Aristolochia fanghi*, *Stephania tetrandra* a *Cocculus* (viz Tab. 2) a právě *Aristolochia fanghi* na rozdíl od *Stephania tetrandra* byla identifikována jako nefrotoxická.

**Tab. 2: Rostlinné druhy *Aristolochia* dovážené pod čínským názvem *Fang Ji*. Nefrotoxická *Aristolochia fanghi* má shodný čínský název s rostlinou *Stephania tetrandra*. Převzato a upraveno<sup>9</sup>.**

Latinský název	Čínský název
<i>Aristolochia fanghi</i>	Guang Fang Ji
<i>Stephania tetrandra</i>	Han Fang Ji
<i>Cocculus trilobus</i>	Mu Fang Ji
<i>Cocculus orbiculatus</i>	Mu Fang Ji

Vzhledem k této souvislosti s čínskou tradiční medicínou, byla nemoc pojmenována jako nefropathie vyvolaná čínskými bylinami (*Chinese Herb Nephropathy, CHN*)<sup>18</sup>, dnes nazývaná jako nefropathie vyvolaná aristolochovými kyselinami (*Aristolochic Acid Nephropathy, AAN*). Dohromady bylo zaznamenáno v Belgii k lednu 1994 71 případů, 35 z nich bylo nuceno okamžitě zahájit léčbu dialysou. Charakteristickým rysem AAN byl fakt, že i po přerušení expozice, docházelo k dalšímu rozvoji onemocnění. Zároveň bylo v Číně mezi lety 1995-1998 pozorováno 12

případů, kdy byly pacienti nuceni podstoupit biopsii v důsledky nevysvětlitelného ledvinného selhání. Jejich zdravotní záznamy nevykazovaly žádnou možnou souvislost s onemocněním ledvin až do doby, kdy bylo zjištěno užití čínských bylin. Přestože pacienti požili čínské byliny z různých zdrojů a pro různé účely, biopsie ledvinné tkáně jasně prokázala souvislost s případy AAN v Belgii. U 7 pacientů bylo nutné zahájit léčbu dialysou, zbylí pacienti byli diagnostikováni postupným progresivním selháním ledvin, urotheliální karcinom se vyvinul u jednoho pacienta<sup>19</sup>. 46% pacientů postižených tímto onemocněním nepomáhá transplantace ledvin a močového měchýře, karcinom přetrvává a rozšiřuje se do sousedních tkání<sup>20</sup>.

Nejen počet onemocnění ale i agresivní průběh onemocnění poukázal na závažnost AAN. Z histologických rozborů ledvinné tkáně pacientů diagnostikovaných AAN je patrná rozsáhlá, hypocelulární, intersticiální sklerosa a tubulární atrofie spojená s rozpadem glomerulů postupujícím od vnitřní do vnější části kůry ledvin. Dále bylo pozorováno fibromykoidní až vláknité zhuštění především interlobulárních tepen, normální či poškozené glomeruly a mírná až střední atypie nebo atypická hyperplasie urotheliální tkáně. Klinické projevy onemocnění zahrnují normální krevní tlak, přítomnost bílých krvinek v moči, nízké hladiny bílkovin v moči a záhy se vyvíjející a velmi častou anemií. Jak histologické rozborů, tak klinické aspekty poukazují na podobnost AAN s Balkánskou endemickou nefropatií<sup>19</sup>.

Současně analýza ledvinné tkáně 5 pacientů s AAN a 6 dalších pacientů s jiným onemocněním ledvin odhalila v tkáni pacientů postižených AAN přítomnost aduktu AAI s DNA, 7-(deoxyadenosin-N<sup>6</sup>-yl)-aristolaktamu I (dA-AAI)<sup>21</sup>. Adukty AA s DNA byly označeny jako biomarkery AA a jejich přítomnost byla spojena s karcinogenní a mutagenní aktivitou AA<sup>22</sup>. O několik let později byla prokázána nejen přítomnost dA-AAI, ale byly nalezeny další adukty AA s DNA, a to 7-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-aristolaktam I (dG-AAI) a 7-(deoxyadenosin-N<sup>6</sup>-yl)-aristolaktam II (dA-

AAII). Nález aduktů dA-AAII koreloval se zastoupením AAI v rostlinném extraktu dovezeného do Belgie pod názvem *Stephania tetrandra*, čímž nejen potvrdil fakt, že pacienti skutečně pozřeli směs AAI a AAI, přirozeně se vyskytující v rostlinných druzích čeledi *Aristolochia*, ale i přímou souvislost AAN s Balkánskou endemickou nefropatií<sup>19</sup>.

### 1.3.2. Balkánská endemická nefropathie

V roce 1956 zaznamenal Tanchev se spolupracovníky zvýšený výskyt chronické nefropathie mezi obyvateli žijícími v okolí řeky Vratsa v Bulharsku<sup>23</sup>. O rok později pozoroval Danilovic obdobně významné incidence tohoto renálního onemocnění mezi obyvateli vesnic nacházejících se v povodí Kulubara v Srbsku. Po příčině pátral výzkumný tým Danilovice ve 12 rodinách obývajících vesnici Sopic, která se zdála být tímto onemocněním nejvíce zasažena. Studie ukazují, že v oblasti Sopic během 15 let zemřelo 37 lidí na chronickou nefropathii a ze 44 přeživších 23 následně trpělo chronickou nefropatií. Zbýlých 21 zůstalo zdravých, přičemž se jednalo především o děti a mladé členy rodiny<sup>24</sup>. V roce 1959 byly podobné případy chronické nefropathie zaznamenány v oblasti Slavonskiho Brodu v Chorvatsku<sup>25</sup>. Zdálo se, že toto onemocnění postihuje pouze obyvatele vesnic v určitých oblastech v povodí Dunaje tj. v oblastech Balkánského poloostrova zahrnující státy jako je Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Chorvatsko, Rumunsko a Srbsko (viz Obr. 4, str. 20). Právě díky svému unikátnímu topografickému rozšíření začala být nemoc označována jako Balkánská endemická nefropatie (*Balkan Endemic Nephropathy, BEN*). Odhaduje se, že dnes je asi 100,000 jedinců v ohrožení BEN, zatímco asi 25,000 nemocí již trpí<sup>26</sup>.



*Obr. 4: Rozšíření Balkánské endemické nefropatie v Bosně a Hercegovině, Chorvatsku, Srbsku, Bulharsku a Rumunsku. Na mapě vidíme ohniskové rozšíření BEN napříč Balkánským poloostrovem. Tato ohniska zahrnují vesměs vesnice ležící na přítocích Dunaje, které se velmi často nacházejí v těsném sousedství. Převzato a upraveno<sup>1</sup>.*

Charakteristickým znakem onemocnění BEN je jeho rodinné avšak ne dědičné rozšíření v rámci endemicky vymezené oblasti. BEN postihuje pouze obyvatele vesnic v zemědělských regionech Balkánského poloostrova. Dosud nebyl zaznamenán případ onemocnění mezi obyvateli větších měst. Nemoc má ohniskový charakter, kdy významně postižené vesnice jsou v těsném sousedství s vesnicemi, které BEN zasaženy nejsou<sup>27</sup>. Doposud bylo onemocnění zaznamenáno v celkem 142 vesnicích v Bosně a Hercegovině, Chorvatsku, Srbsku, ve 40 usedlostech v Bulharsku a v dalších

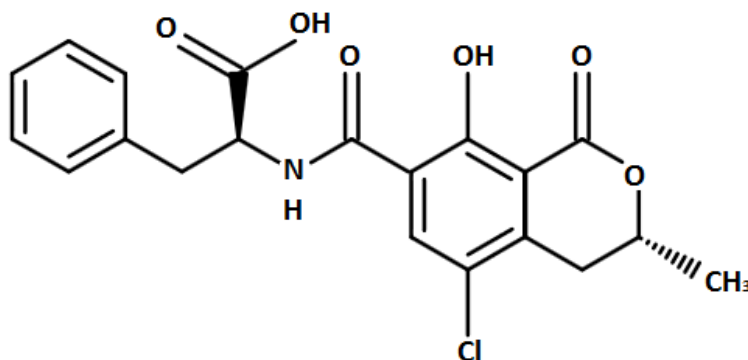
40 vesnicích a malých městech v Rumunsku<sup>28</sup>. Avšak i přes charakteristickou distribuci se objevily případy BEN i v dalších regionech<sup>29</sup>. Ve většině případů se jedná o domácnosti, kde nemocí trpí několik členů rodin jedné nebo více generací. V rámci jedné vesnice pak postižené domácnosti žijí ve své těsné blízkosti. BEN postihuje jedince ve věku 40-60 let obou pohlaví s mírnou převahou ženského pohlaví. Dosud nebyl zaznamenán případ, kdy by BEN onemocnělo dítě<sup>30</sup>.

BEN je charakterizována jako tubulointersticiální nefropathie s pomalým postupným vývojem končícím selháním ledvin. Je spojena s výskytem urotheliálního karcinomu (*Upper Urothelial Carcinoma, UUC*) ledvinné pánvičky a močovodů. A právě UUC je nejčastější příčinou smrti pacientů s BEN. Zároveň je u pacientů trpících BEN větší pravděpodobnost vývoje UUC i po transplantaci ledvin<sup>31</sup>, kdy je rozdíl v progresi v UUC po transplantaci mezi běžnou populací (69%) a populací postiženou BEN (43,7%) enormní a dokazuje úzkou souvislost UUC s BEN<sup>32</sup>. Nemoc se projevuje zpočátku asymptomaticky a zůstává latentní po mnoho let. První projevy přicházejí až s postupujícím renálním selháním. Naneštěstí jsou tyto symptomy velmi variabilní. V důsledku chronického ledvinného selhání dochází zpravidla ke zvýšené diuréze. V počátečních stádiích BEN si ledviny zachovávají normální velikost, ovšem jak nemoc postupuje, ledviny se díky renálnímu selhání zmenšují<sup>32</sup>. Dalším typickým znakem doprovázejícím onemocnění je anémie, a to taková anémie, která je disproporciální vzhledem ke stupni ledvinného poškození. U pacientů v počáteční fázi ledvinné nedostatečnosti pozorujeme výrazně nižší koncentrace erytrocytů<sup>33</sup>. Zároveň pacienti podstupující dialysu v důsledku BEN vyžadují mnohem vyšší dávky erythropoetinů než pacienti, kteří podstupují dialysu v důsledku jiných renálních onemocnění končících ledvinným selháním<sup>34</sup>. Analýza moči pacientů odhalila velmi nízké hodnoty bílkovin<sup>35</sup>. Charakteristickým se pak jeví řídký sediment moči, který obsahuje velmi malé množství erytrocytů a leukocytů. Přítomnost krve v

moči pak obvykle indikuje přítomnost karcinomu v ledvinném ústrojí<sup>34</sup>. U některých pacientů lze v počátečních stádiích onemocnění pozorovat zvýšený krevní tlak. Pokud ke zvýšení tlaku dochází, pak se zpravidla jedná o hypertenzi mírnou až střední<sup>37</sup>.

K dnešnímu dni bylo postulováno několik hypotéz týkajících se původem BEN. Byla studována řada látek, které by potenciálně mohly způsobovat BEN. Mezi adepty patřily ionty těžkých kovů a metaloidů, mykotoxiny či organické látky nacházející se v lignitovém podloží endemických oblastí a v neposlední řadě aristolochové kyseliny. Co se týče iontů kovů a metaloidů, předpokládalo se, že příčinou BEN mohou být jak jejich vysoké, tak nízké koncentrace. K této domněnce vedly nálezy některých prvků jako je křemík, selen nebo olovo ve vodě v oblastech postižené BEN<sup>36</sup>. Následně byla BEN spojena s vysokými koncentracemi těchto prvků ve vodě<sup>37</sup> a vznik karcinomů byl přisouzen expozici křemíku a niklu<sup>38</sup>. Po několika letech intensivního výzkumu byla tato hypotéza vyvrácena. Ukázalo se, že distribuce prvků, především selenu, podezřelých z vyvolání BEN je rovnoměrná v endemických i neendemických regionech, a tudíž nemůže být označena za příčinu způsobující BEN<sup>39</sup>. Další látkou podezřelou z BEN byl ochratoxin A (OTA) jako přirozeně se vyskytující mykotoxin kontaminující řadu rostlinných produktů (*viz. Obr. 5, str. 23*). Předpokládalo se, že obyvatelé endemických oblastí jsou vystaveni relativně vysokým koncentracím OTA a že by právě OTA mohl hrát klíčovou roli v BEN. OTA byl označen za potenciální nefrotoxin a renální karcinogen pro hlodavce. Přestože je tento mykotoxin považován za potenciální karcinogen pro člověka (*IARC*), nikdy u člověka nebyl spojen s žádným typem nefropatie u člověka<sup>40</sup>. Navíc mechanismus vzniku OTA-derivovaných aduktů s DNA nebyl dodnes zcela objasněn. Přestože některé studie s sebou přinesly pozitivní nálezy aduktů DNA s OTA<sup>41</sup>, nepodařilo se v následujících letech detekovat radioaktivitu OTA z radioaktivně značeného OTA v DNA v systémech *in vivo* a *in vitro*<sup>42</sup>. To v roce 2006

dovedlo Evropský úřad pro bezpečnost potravin (*European Food Safety Authority, EFSA*) k závěru, že nemáme natolik dostačující důkazy, abychom byli schopni označit OTA jako původce BEN <sup>43</sup>.



Ochratoxin A

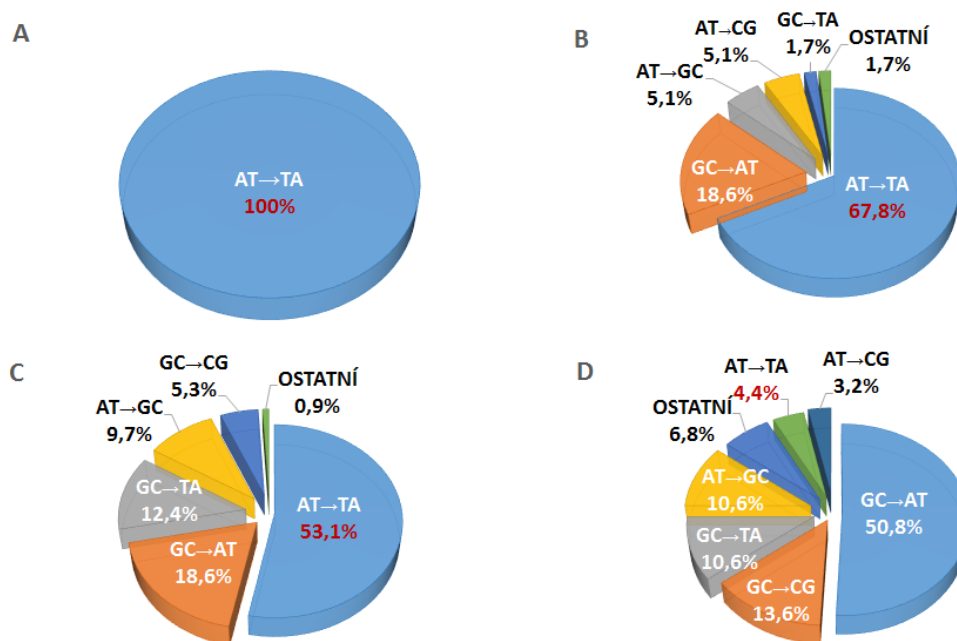
*Obr. 5: **Struktura OTA.** OTA je mykotoxin klasifikovaný jako potenciální karcinogen pro člověka (Skupina 2B, IARC).*

Za jednu z dalších potenciálních příčin BEN byl považován deposit lignitu z období Pliocénu, jehož oblast rozšíření se zdála korelovat s endemickými regiony. Předpokládalo se, že nahromaděním toxických organických látek v lignitovém podloží může dojít k jejich následnému uvolnění a posléze kontaminaci pitné vody. Přestože koncentrace těchto organických látek v podloží je velmi nízká, dlouhodobá expozice či jejich akumulace v tkáních by mohla vyvolat zdravotní komplikace se symptomy podobnými BEN. Mělo se za to, že by pitná voda v oblastech postižených BEN mohla obsahovat polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), aromatické aminy, fenoly a ftaláty pocházející z hnědého uhlí. Přítomnost těchto látek byla skutečně v podloží některých endemických oblastí prokázána<sup>44</sup>, nicméně studie Voice se spolupracovníky neprokázala zvýšené hladiny žádných ze zmíněných polutantů a zároveň ani nezaznamenala rozdíly mezi koncentracemi chemických látek v pitné vodě mezi oblastmi endemickými a neendemickými<sup>45</sup>. Lignitová hypotéza byla zavržena stejně



jako hypotézy předchodí a BEN byla přisouzena aristolochovým kyselinám. AA se jako nefrotoxické a karcinogenní látky ukázaly být právě tou dlouho hledanou primární příčinou vzniku BEN<sup>46,47</sup>. Původní hypotéza vycházející z AA byla navržena již Kazantisem a Ivicem v roce 1967. Zjistilo se, že rostliny *Aristolochia*, především zástupce *Aristolochia clematitis*, rostou jako plevel v polích endemických oblastí a že velice pravděpodobně dochází při zpracování obilovin k jejich kontaminaci právě zástupci rodu *Aristolochia*. U experimentálních zvířat, která byla krmena moukou obsahující *Aristolochia clematitis*, se záhy vyvinula nefropathie. Histologický rozbor zvířecích tkání prokázal podobnost s tkáněmi pacientů trpících BEN. Zároveň se u zvířat po injekčním podání vodného roztoku extraktu z *Aristolochia clematitis* vyvinuly sarkomy, což poukazovalo na potenciální karcinogenitu AA<sup>48</sup>. Přestože důkazy jasně hovořily pro AA jako původce BEN, byla tato hypotéza opomíjena po mnoho let až do roku 1993, kdy Vanherweghem se spolupracovníky popsali již výše zmíněnou AAN. Uvedená onemocnění vykazovala podobnost především na základě histologických rozborů. K definitivnímu potvrzení klíčové role AA v BEN přispěl v roce 2004 případ pacienta trpícího AAN, u kterého byla nalezena specifická transversní mutace AAG → TAG (transverse A:T → T:A) v kodonu 139 (Lys → Stop) na exonu 5 tumorového supresorového genu TP53<sup>48</sup>. Právě tyto A:T → T:A transversní mutace byly nalezeny u pacientů s BEN, u kterých se vyvinul urotheliální karcinom (viz Obr. 6, str. 25). Tato zřejmá selektivita mutací výlučně adeninových residuí v nádorech močových cest vyvolaných AA odpovídá vysokému zastoupení aduktů dA-AAI v cílových tkáních pacientů s BEN. Tento adukt je možné detekovat v renální tkáni pacientů s BEN až desítky let po expozici AA<sup>49</sup>. Zároveň mutovaný kodon 139 lidského genu TP53 odpovídá kodonu 61 (CAA) genu H-ras v hlodavcích, přičemž po expozici zvířat AA vykazoval kodon 61 shodné A:T → T:A transversní mutace jako kodon 139<sup>50</sup>. V závislosti na těchto experimentech byly tyto charakteristické A:T → T:A mutace genu

TP53 v nádorech urotheliální tkáně označeny jako biomarkery expozice AA v kombinaci se specifickými adukty AA s DNA v urotheliálních tkáních pacientů trpících AAN a BEN<sup>50</sup>.



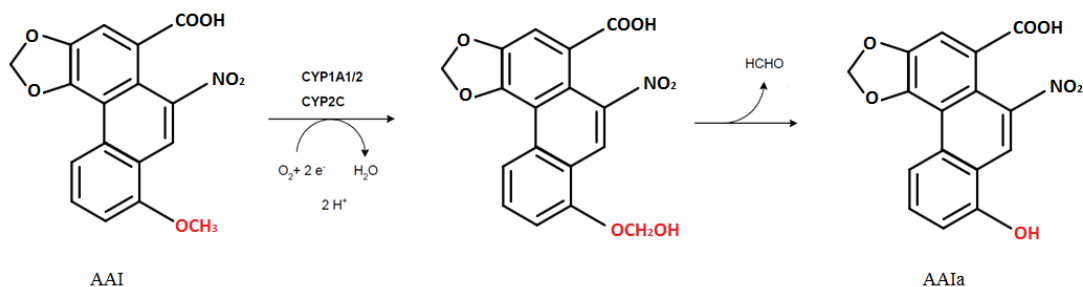
Obr. 6: **Mutace v genu TP53.** Mutace v TP53 v UUC vyvolaných AAN ve Velké Británii,  $n=1$  (A), mutace v TP53 v UUC vyvolaných BEN v Chorvatsku, Bosně a Hercegovině, Srbsku,  $n=59$  (B), mutace v TP53 v UUC vyvolaných AAN populace v Taiwanu,  $n=113$  (C) a mutace v TP53 v případě UUC nevyvolaných působením AA,  $n=1\,127$  (D)<sup>1</sup>.

## 1.4. Metabolismus aristolochových kyselin

Aristolochové kyseliny se pro živočichy a pro člověka řadí mezi xenobiotika. Xenobiotika jsou v organismu metabolicky přeměňována. Tato biotransformace může být buďto detoxikační nebo aktivační. Detoxikační biotransformace vede k eliminaci xenobiotika z buňky a jeho exkreci z organismu, zatímco aktivační metabolická přeměna resultuje v produkci toxičtějších sloučenin, než bylo parentální xenobiotikum. Obdobně tedy mohou být AA detoxikovány či bioaktivovány.

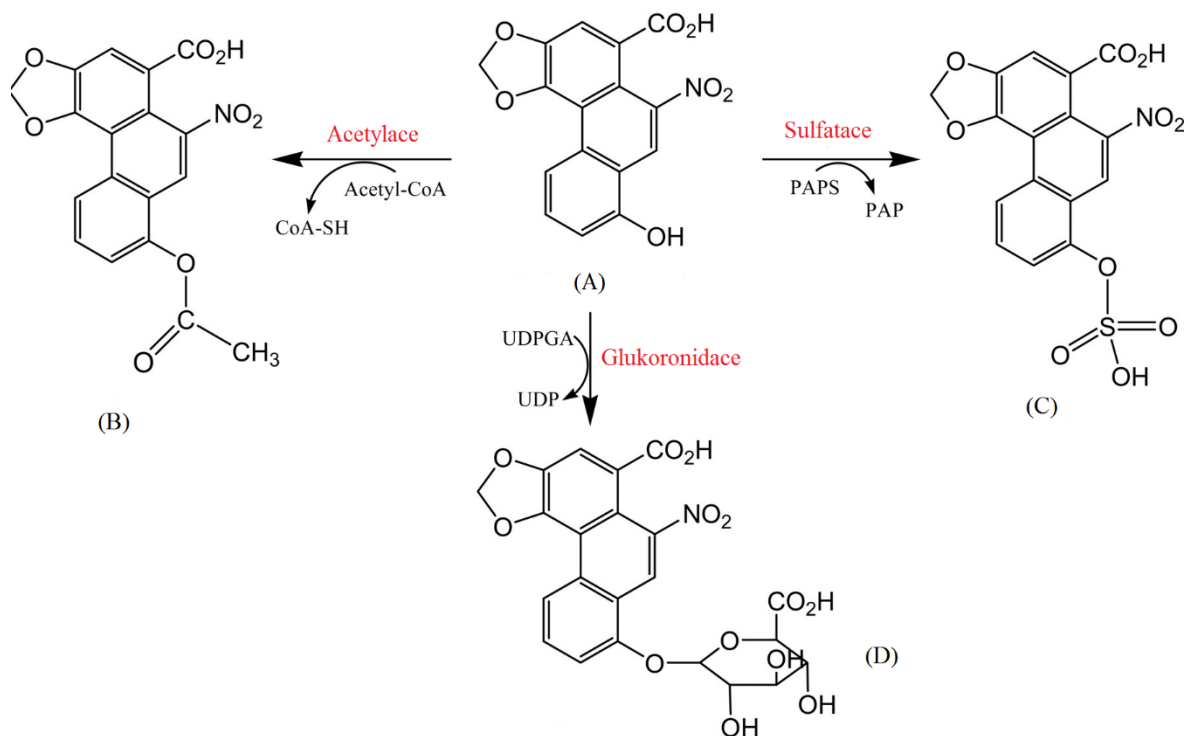
### 1.4.1. Detoxikace aristolochových kyselin

Obecně lze biotransformaci xenobiotika rozdělit na dvě fáze. V první tzv. derivatisační fázi dochází k částečné polarizaci cizorodých látek za účelem zvýšení jejich hydrofility. Molekula xenobiotika zpravidla podléhá hydroxylaci či jiné oxidaci. Ve druhé, tzv. konjugační, fázi se již částečně polarizované xenobiotikum konjuguje s endogenními látkami např. s kyselinou glukuronovou, glutathionem či aktivním sulfátem nebo acetátem. AAI v I. fázi biotransformace podléhá konkrétně O-demethylaci, která je katalysována výhradně cytochromy P450 (CYP). Výsledkem této reakce je hlavní detoxikační metabolit AAI, a to 8 - hydroxyaristolochová kyselina I (aristolochová kyselina Ia, AAIIa). AAIIa vzniká ve dvou krocích<sup>51</sup>. Nejdříve reaguje kyslík s methoxy skupinou AAI a vzniká  $\alpha$ -C-hydroxylovaný meziprodukt. Následně se uvolňuje molekula formaldehydu a vzniká AAIIa (viz Obr. 7). Enzymy, které se podílejí na biotransformaci AAI, jsou zejména CYP1A a CYP2C<sup>52</sup>.



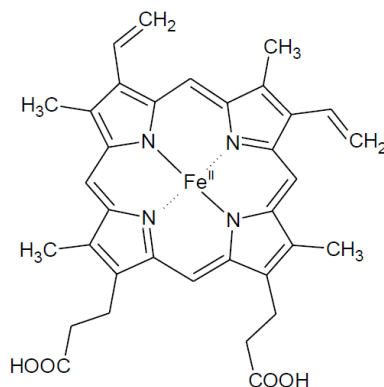
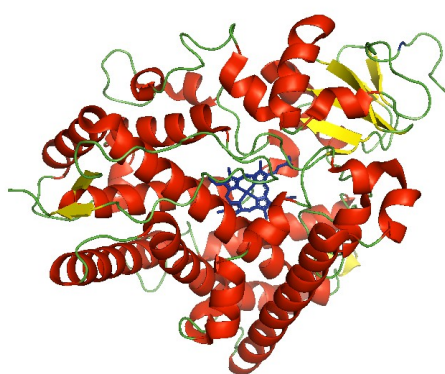
*Obr. 7: I. fáze biotransformace AAI. CYP1A1/2 nebo CYP2C katalysují přeměnu AAI na AAIIa. V prvním kroku O-demethylace dochází reakcí kyslíku s methoxy skupinou AAI za vzniku  $\alpha$ -O-hydroxylovaného meziproduktu AAI, následně se odštěpuje molekula formaldehydu a vzniká finální detoxikační produkt – AAIIa. Převzato a upraveno<sup>54,1</sup>.*

Ve II. fázi biotransformace se AA Ia konjuguje s kyselinou glukuronovou, aktivním sulfátem a acetátem. Vznikají N-glukosiduronáty, O-glukosiduronáty AA Ia a sulfáty či acetáty AA Ia (viz Obr. 8)<sup>53</sup>.



*Obr. 8: II. fáze biotransformace AA I. AA Ia (A) se konjuguje s acetátem za vzniku acetátu AA Ia (B), s kyselinou glukuronovou za vzniku O-glukosiduronátu AA Ia (C) a sulfátem za vzniku sulfátu AA Ia (D). Převzato a upraveno<sup>1</sup>.*

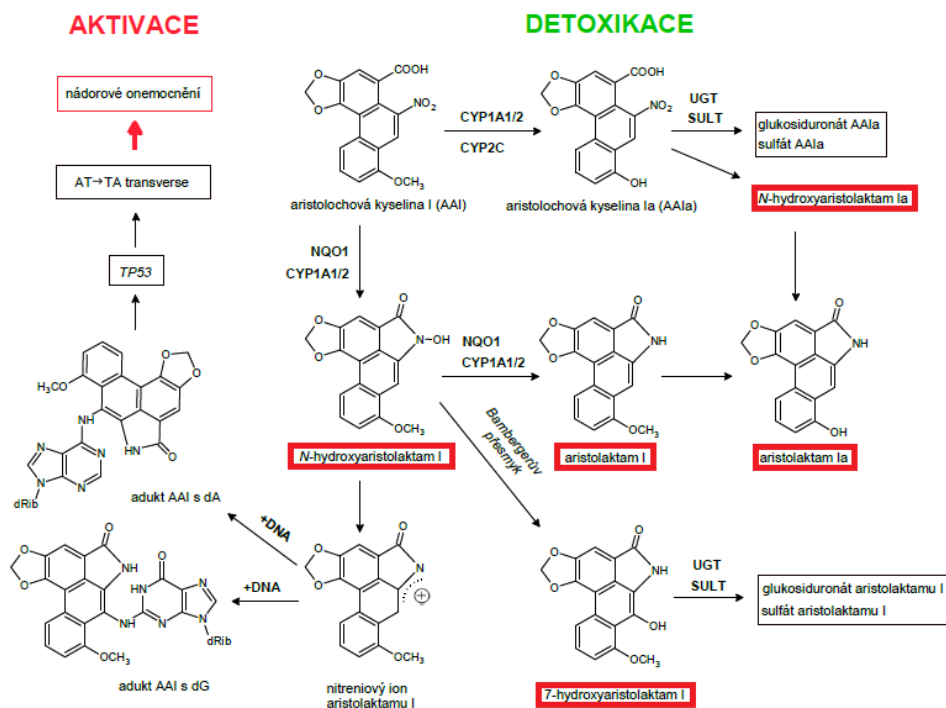
AA II pravděpodobně není hydroxylována na uhlíku C8 obdobně jako AA I (Stiborová, Bárta, osobní sdělení). Klíčovým enzymem pro detoxifikaci AA I je CYP1A1/2. Majoritní úlohu v hlodavcích hraje CYP1A2 (viz Obr. 9, str. 28). V lidském organismu je tomu naopak. Nejefektivnějším detoxikačním enzymem AA I je CYP1A1. Vedle CYP1A se na detoxikaci AA I v potkaních játrech podílí CYP2C, a to především CYP2C11 v samcích.<sup>54, 55</sup> Potkaní CYP2C11 a CYP2C6 mají substrátovou specifitu podobnou s lidskými CYP2C9, sdílí spolu jak sekvenční, tak funkční analogii<sup>58</sup>.



Obr. 9: Vlevo: Struktura lidského CYP1A2 s ferroprotoporfyriem IX uprostřed (modře). Barveno dle sekundární struktury, PyMol 1.7.4.5 Edu, PDB kód: 2HI4. Vpravo: Struktura ferroprotoporfyriu IX.

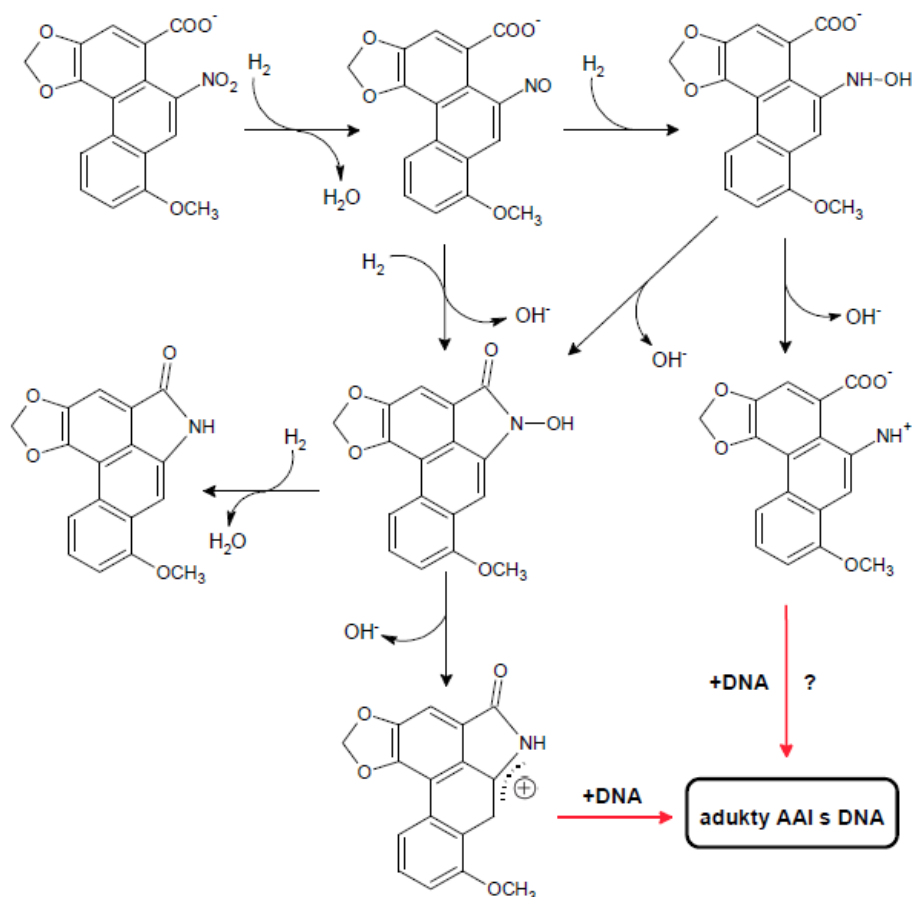
## 1.4.2. Bioaktivace aristolochových kyselin

Hlavními produkty redukčního metabolismu aristolochových kyselin jsou tzv. aristolaktamy, přičemž se jeden z meziproduktů vznikající v průběhu tvorby aristolaktamů, N-hydroxyaristolaktam I, přeměňuje na nitreniový ion, který se posléze váže na DNA a vytváří tak kovalentní adukty s DNA (viz Obr. 10).



*Obr. 10: Detoxikační (oxidační) a aktivační (redukční) metabolismus AAI. Na obrázku vidíme, že produktem biotransformace AAI je řada aristolaktamů, přičemž nejdůležitější roli hraje N-hydroxyaristolaktam I, který vytváří kovalentní adukty s adenosinem a guanosinem. Převzato a upraveno<sup>56</sup>.*

Aristolaktam I (AlacI) a aristolaktam II (AlacII) patří mezi hlavní produkty metabolismu AA v lidském organismu. Jak již bylo zmíněno, v prvním kroku bioaktivace je AAI redukována na N-hydroxyaristolaktam I, přičemž N-hydroxyaristolaktam I může být dále redukován na AlacI nebo přeskupen na 7 – hydroxyaristolaktam I. Klíčovým krokem vedoucím ke karcinogenesi je však rozpad N-hydroxyaristolaktamu I na acylnitreniový ion<sup>54</sup>. Ten interaguje s purinovými basemi DNA za vzniku stabilních kovalentních aduktů dA-AAI, dA-AAII a dG-AAI<sup>22</sup>. Analýsa aduktů AAI s DNA v tkáních pacientů postižených AAN a BEN potvrdila, že je to právě N-acylnitreniový ion, který působí jako tzv. ultimativní karcinogen (viz Obr. 11, str. 30)<sup>22,11</sup>. Dalším metabolitem, který je často produkován v experimentálních zvířatech vystavených působení AA, je aristolaktam Ia. Aristolaktam Ia může vzniknout dvěma způsoby, a to buďto O-demethylací AAI na AA Ia a následnou redukcí na aristolaktam Ia nebo demethylací AlacI. Vzhledem k tomu, že nebyly nalezeny žádné adukty AA Ia, 7 – hydroxyaristolaktamu I a aristolaktamu Ia s DNA v lidských ani v zvířecích modelech, považují se tyto metabolity za produkty detoxikační cesty. Za aerobních podmínek je tedy AAI primárně detoxikována, zatímco za anaerobních podmínek je bioaktivována. Většina metabolitů AAI je v moči a výkalech hlodavců přítomna ve formě konjugátů zahrnující estery O-glukosiduronátů, O-acetáty či O-sulfáty AA Ia nebo N- a O-glukosiduronáty aristolaktamu Ia<sup>58</sup>.



Obr. 11: **Předpokládaný mechanismus aktivace AAI.** Tato redukční aktivace vede k tvorbě kovalentních aduktů AAI s DNA. Nitroskupina AAI je postupně redukována nejprve na nitrososkupinu a poté na N-hydroxylamin. Obě struktury jsou stabilizovány interakcí s karboxylovou skupinou v peri posici. Následně podléhá karboxylová skupina kondenzační reakci s N-hydroxyskupinou a vzniká N-hydroxyaristolaktam. Převzato a upraveno<sup>1</sup>.

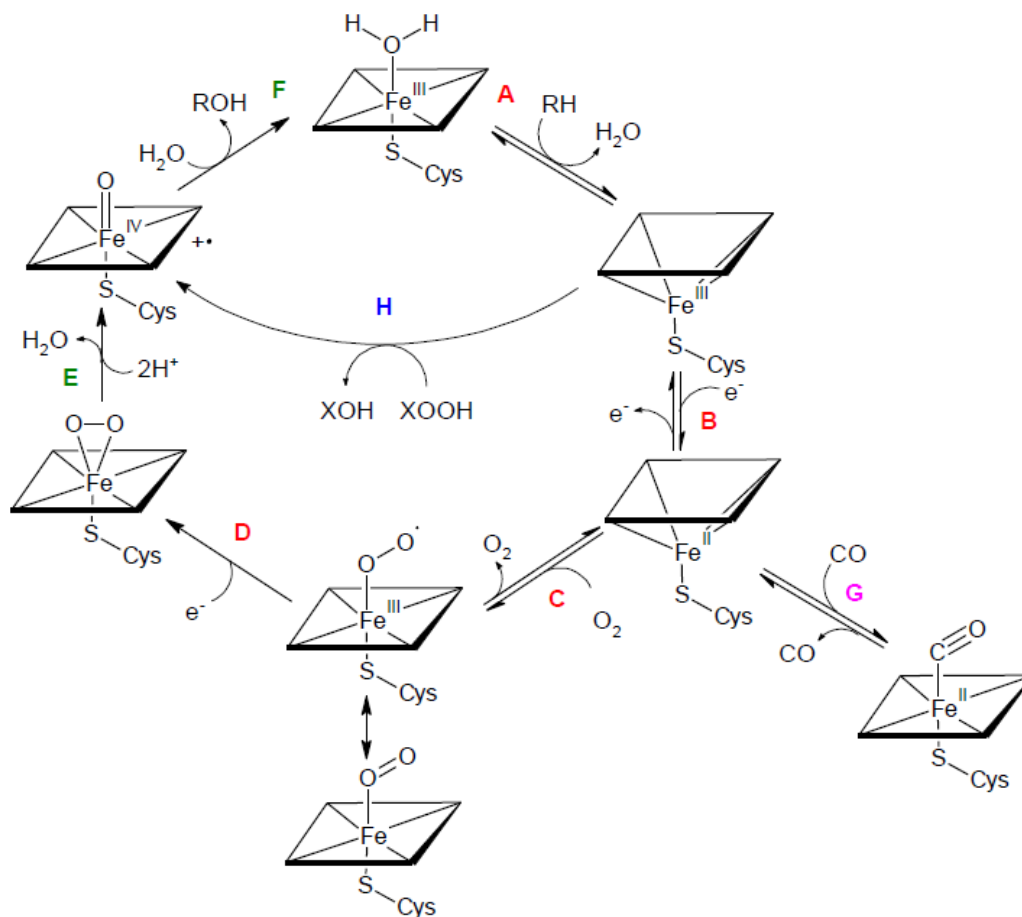
Hlavním enzymem podílejícím se na nitroredukci AAI v potkaních i lidských organismech je NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (NQO1). Mimo tohoto enzymu se na aktivaci AA podílí také enzym NADPH:CYP reduktasa (POR) a peroxidasa prostaglandin H synthasa 1 (COX-1)<sup>55,56</sup>.

### 1.4.3. Enzymy detoxikačního (oxidačního) metabolismu aristolochových kyselin

Jak již bylo zmíněno, enzymy oxidačně detoxikující AAI jsou výhradně CYP. Tyto enzymy byly poprvé popsány v roce 1958<sup>57,58</sup>. Dle názvoslovného systému se rodiny CYP dělí to tzv. podrodin, které se odlišují sekvenčním stupněm homologie. Pro zařazení enzymu do rodiny musí být sekvence shodná ve 40%, zatímco pro zařazení stejného enzymu do podrodiny se musí shodovat v 55% a více. Název cytochromu P450 se pak označuje zkratkou CYP, arabskou číslicí představující rodinu, velkým písmenem představujícím podrodinu a konečně arabskou číslicí odpovídající dané isoformě enzymu (např.: CYP1A1). CYP tvoří superrodinu hemothiolátových enzymů, pod které spadá více jak 2 000 jejich jednotlivých druhů. Podílejí se na biosynthese steroidních hormonů a hrají významnou roli v metabolismu xenobiotik, mohou se rovněž podílet na aktivaci prokarcinogenů. Nachází se v živočišných a rostlinných organismech, houbách, bakteriích. V živočišných organismech se vyskytují v řadě orgánů, jako jsou plíce, ledviny či mozek, avšak majoritní výskyt je přisuzován játrům, jako hlavnímu orgánu detoxikace živočichů. V savcích jsou to cytochromy P450 rodiny 1, 2 a 3 (CYP1, CYP2, CYP3), které jsou klíčové právě v I. fázi biotransformace xenobiotik, v lidských buňkách jsou to pak konkrétně CYP podrodiny 1A, 2A, 2C, 2E, 2D a 3A. CYP jsou v buňce lokalizovány v membráně endoplasmatického retikula a mitochondriích. Tam společně s dalšími enzymy (např.: POR) tvoří systém oxidas/oxygenas se smíšenou funkcí (*Mixed Function Oxidase/Oxygenase System, MFO System*) (Obr. 12, str. 32). V MFO systému působí CYP jako tzv. terminální oxidas, přičemž má dvě základní funkce, a to funkci oxidasovou a oxygenasovou. „Jádro“ této terminální oxidasy tvoří ferroprotoporfyrin IX, který v redukovaném stavu ochotně tvoří komplex s oxidem uhelnatým. Podstatou oxidasové funkce je aktivace molekulárního

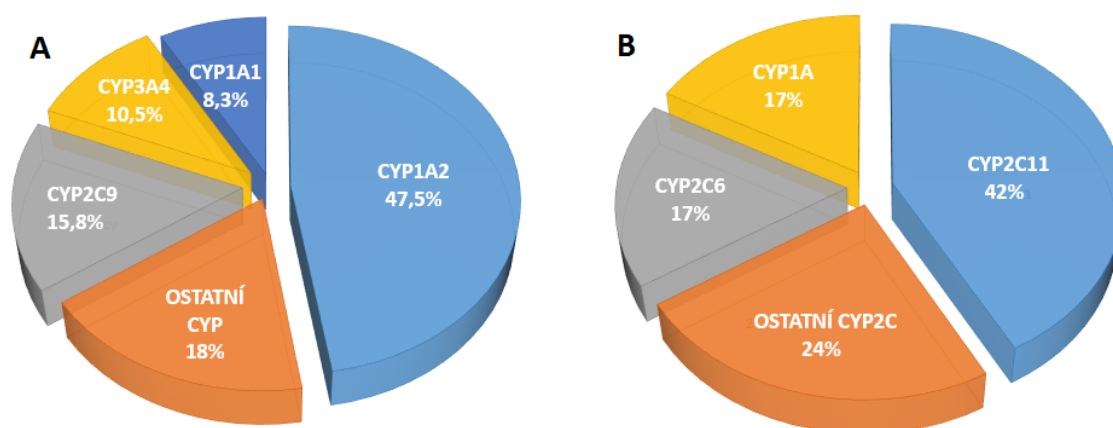


kyslíku, který bývá využíván v dalších reakcích, s nimiž je spojená oxygenasová funkce CYP, kdy dochází k zabudování takto aktivovaného kyslíku do molekuly substrátu.



**Obr. 12: Reakční mechanismus katalysy MFO.** V první fázi dochází aktivaci dvouatomové molekuly kyslíku (A-D), v druhé fázi dochází k zabudování jednoho z atomů molekuly kyslíku do molekuly substrátu (E-F). Substrát se přiblíží k aktivnímu místu CYP, dojde ke změně konformace enzymu. Zároveň dochází k redukci trojmocného železa na dvojmocné, které koordinuje molekulu kyslíku (G). Elektrony potřebné pro redukci iontů železa poskytuje především POR (B a D). Krom toho mají CYP i tzv. peroxidasovou aktivitu, kdy je jako substrát využit organický peroxid (H). Převzato<sup>56</sup>.

V metabolismu AA jsou to právě CYP, které hrají důležitou roli. CYP podrodiny 1A mají dvojí úlohu. Jsou schopné *in vitro* jak redukovat AA, tak v případě AAI je i oxidovat. Další CYP jako jsou CYP2C, 3A, 2D6, 2E1 či 1B1 vytváří taktéž AAIA, ovšem s daleko menší efektivitou. Jelikož jsou játra považována za hlavní orgán biotransformace xenobiotik, byla detailně studována účinnost lidských a potkaních jaterních CYP oxidovat AAI<sup>54</sup>. Jako hlavní enzymy podílejícími se na oxidaci v lidských játrech byly identifikovány CYP1A2 a v menší míře CYP2C9, CYP3A4 a CYP1A1, zatímco v potkaních jaterních buňkách to byly CYP podrodiny 2C a 1A (viz Obr. 13)<sup>54</sup>.



**Obr. 13: Podíl enzymů při oxidační detoxikaci AAI na AAIA v lidských (A) a potkaních (B) játrech. Převzato<sup>54</sup>.**

Zajímavé jsou výsledky experimentů oxidační demethylace AAI na AAIA pomocí myších CYP1A1/2 *in vivo*. Předpokládalo se, že pokud zvířata nebudou schopna detoxikovat AAI demethylací, budou zaznamenány podstatně vyšší koncentrace nemetabolisované AAI, která může být následně bioaktivována na AAI-DNA adukty a resultovat v renální selhání. Skutečně byly nalezeny vysoké koncentrace aduktů AAI s DNA v myších knock-outovaných liniích, a to především v ledvinách<sup>59</sup>.

#### 1.4.4. Enzymy aktivačního (redukčního) metabolismu aristolochových kyselin

Klíčovou roli v redukční aktivaci AAI hraje NAD(P)H: chinonoxidoreduktasa I (NQO1)<sup>60</sup>. NQO1 je cytosolární enzym, který byl objeven v roce 1958 L. Ernsterem a F. Navaziem<sup>61</sup>. Díky tomu, že NQO1 využívá jak NADH (DPNH), tak NADPH (TPNH), byl původně pojmenována jako DT-diaforasa<sup>62</sup>. Vyskytuje se v eukaryotických systémech od kvasinek po savce. Je exprimována jak endotheliálních tak epitheliálních tkáních, nejvíce pak v játrech, ledvinách a plicích. NQO1 katalysuje redukci vitamínu K v játrech. Ještě významnější je její schopnost redukovat chinony na hydrochinony, které jsou následně konjugovány s endogenními látkami a vyloučeny z těla. Ke katalýze jsou potřebné dva elektrony, ale probíhá jen jedním krokem. V důsledku toho pak na rozdíl od CYP, nedochází ke vzniku semichinonů a ROS. NQO1 je tedy v řadě buněk nezbytný detoxifikační enzym, podílí se na ochraně buňky před oxidačním stresem. Katalysuje redukci nejen chinonů, ale i nitroaromátů. Studie zabývající se participací enzymově katalysovaných konjugčních reakcí při redukční bioaktivaci AAI *in vivo* přinášejí rozporuplné výsledky<sup>54</sup>. Experimenty *in vitro* naznačují, že aktivita NQO1 koreluje se zvýšenou tvorbou aduktů AAI s DNA<sup>63,64</sup>. V rozporu s tím, Meinel se spolupracovníky<sup>65</sup> pozorovali, že exprese SULT1A1 zvyšuje mutagenecitu AA. Na redukční aktivaci AAI se podílí i cytochromy P450, a to především CYP1A2, v menší míře pak CYP1A1. Minoritní roli hrají i další mikrosomální enzymy např.: NADPH:cytochrom P450:oxidoreduktasa (POR).

### 1.4.5. Role genetického polymorfismu v metabolismu aristolochových kyselin

Pouze u 5-10% obyvatel endemických oblastí byla zaznamenána BEN<sup>46</sup>, obdobně jen 10-20% pacientů, kteří podstoupili kúru pro redukci tělesné hmotnosti na klinice v Belgii, onemocnělo ANN<sup>46</sup>. Otázka proč, dochází k vývoji těchto dvou nefropathií pouze u části populace a zdaleka ne u všech jedinců vystavených působení AA, zůstává stále nerozřešena. V úvahu přicházejí faktory jako je efektivita detoxikace a/nebo bioaktivace AA, s ní spojené expresní hladiny biotransformačních enzymů podílejících se na metabolismu AA či jejich genetický nebo fenotypový polymorfismus, a další genetické a/nebo epigenetické faktory<sup>53</sup>.

## 2. Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce bylo shromáždění informací o metabolismu aristolochových kyselin. První cíl experimentální části práce byl zaměřen na studium ovlivnění exprese genů participujících na metabolismu AA. Z orgánů potkanů vystavených působení AAI, AAI a jejich směsi a potkanů, kteří nebyli vystaveni žádné z výše zmíněných látek (kontrola) byla izolována mRNA. Metodou RT-PCR pak bylo sledováno množství mRNA enzymů CYP1A1, CYP1A2, CYP2C11 a POR. Druhý cíl experimentální části bakalářské práce byl soustředěn na studium ovlivnění oxidačního metabolismu AAI. K tomu bylo využito mikrosomů izolovaných z orgánů potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsi, a z potkanů nepremedikovaných (kontrola). Pomocí metody RP-HPLC byl detekován detoxikační produkt – aristolochová kyselina Ia a bylo kvantifikováno její vzniklé množství.

### 3. Materiály a metody

#### 3.1. Použitý materiál a chemikálie

##### 3.1.1. Chemikálie

Applied Biosystems, USA

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (dNTP mix, RT pufr, RNase inhibitor, RT náhodné primery), TaqMan Gene Expression Assays

Biocel AIO, USA

Milli-Q ultračistá voda

Fluka, Švýcarsko

1, 1, 1 – tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

Invitrogen, USA

Trizol Reagent

Lachema Brno, Česká republika

ethanol, kyselina octová, methanol,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$

Lacher, Česká republika

isopropanol, chloroform

Linde, Česká republika

kapalný dusík

Merck, Německo

acetonitril

Penta, Česká republika

ethylacetát

Roche Diagnostics, Německo

FastStart Essential DNA Probe Master, RNase free voda

Sigma, USA

glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, NADPH, NADP<sup>+</sup>

### 3.1.2. Přístroje

Centrifugy

Centrifuga 5418, Eppendorf, úhlový rotor (*Eppendorf, Německo*)

Minicentrifuga Spectrafuge, úhlový rotor (*Labnet, USA*)

Automatické pipety

Autoclavable Nichipet EX (*Nichiryo, Japonsko*)

Eppendorf Multipette M4 (*Eppendorf, Německo*)

Inkubátory

Thermomixer Eppendorf Compact (*Eppendorf, Německo*)

Magnetická míchačka

Variomag (*Monotherm, Německo*)

#### pH metr

ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (*ATI Orion, USA*),  
kalibrace pomocí  
standardů (*Hamilton, Švýcarsko*)

#### Sonikátor

ELMAsonic E 30 H (*P-lab, Česká republika*)

#### Spektrofotometr

Carry 300 spectrophotometer (*Varian, USA*)

#### Systém RT-PCR

RotorGene 2000 (*Corbett Research, Austrálie*), program RotorGene  
5 (*Corbett Research, Austrálie*)

#### Systém HPLC

pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS Detector UVD 170s/340s (*USA*)

Degasys D6-1210 Dionex

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LC0 101

kolona: Machery-Nagel, Nucleosil 100-S C18 40; 4 x 250 mm  
(Německo)

program: Chameleon™ 6.11 build 490

#### Thermocykler

T100™ Thermal Cycler (*Bio-Rad, USA*)



### Další přístroje

vortex Minishaher (*IKA, Německo*), vortex 6VLab (*Gilson, Německo*),  
odparka Labconco (*BioTech, Česká republika*)

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Premedikace laboratorního potkana

Pokusy byly provedeny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (359/2012 Sb.) a vyhláškou Ministerstva zemědělství o ochraně pokusných zvířat (419/2012 Sb.). Experimenty byly prováděny v laboratořích Státního zdravotního ústavu (Praha) Dr. Mrázem a Ing. Duškovou. Celkem 10 potkanů kmene Wistar bylo aklimatizováno po 5 dní při teplotě 22°C. Čtyři skupiny potkanů o hmotnosti 150-170 g byly premedikovány. První skupina o třech potkanech byla vystavena působení jedné dávky AAI rozpuštěné v 1% NaHCO<sub>3</sub> (20 mg/kg tělesné hmotnosti, *i.p.*), druhé skupině o třech potkanech byla podána jedna dávka AAI rozpuštěná v 1% NaHCO<sub>3</sub> (20 mg/kg tělesné hmotnosti, *i.p.*) a třetí skupina o třech potkanech byla premedikována jednou dávkou směsi AA (AAI : AAI v poměru 1 : 1) rozpuštěnou v 1% NaHCO<sub>3</sub> (20 mg/kg tělesné hmotnosti, *i.p.*). Kontrolní potkan byl vystaven pouze slunečnicovému oleji a 1% NaHCO<sub>3</sub>. Zvířata byla usmrcena 24 hodin po podání AA. Byla jim odebrána játra, ledviny a plíce, které byly uloženy v -80°C k následnému zpracování. K dalším experimentům týkajícím se této bakalářské práce byly použity pouze játra a ledviny.

### 3.2.2. Isolace mRNA z jater a ledvin potkana

mRNA byla izolována za laboratorní teploty ze zmražených potkaních orgánů za užití Trizol Reagentu (*Invitrogen, USA*) postupem

popsaným výrobcem. Experiment byl proveden ve flow boxu (*LABOX, Česká republika*) a veškeré použité nástroje byly sterilisovány. Potkaní játra byla homogenisována tloučkem ve třecí misce za postupného přidávání tekutého dusíku. Následně byla homogenisovaná tkáň rovnoměrně rozdělena do 14 mikrozkušavek. Ke každému vzorku byl pipetován 1 ml Trizolu a směs byla promíchána (*Minishaher IKA, Německo*) po dobu 10 sekund. Jaterní tkáň byla centrifugována (*centrifuga Eppendorf 5415R, 12 000 x g, úhlový rotor*) 10 minut při 4°C. Supernatant byl odebrán a přenesen do čisté mikrozkušavky. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 200 µl chloroformu a vzorky byly promíchány (*Minishaher IKA, Německo*) po dobu 15 sekund. Takto připravená směs byla nejprve 3 minuty inkubována při laboratorní teplotě a poté byla „stočena“ (*Minishaher IKA, Německo*) po 10 sekund a centrifugována (*centrifuga Eppendorf 5415R, 12 000 x g, úhlový rotor*) 10 minut při 4°C. Z každé mikrozkušavky byl odebrán supernatant do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. K supernatantu bylo přidáno vždy stejné množství ledového isopropanolu, směs byla zamíchána a inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byla směs centrifugována (*centrifuga Eppendorf 5415R, 12 000 x g, úhlový rotor*) 5 minut při 4°C a opět byl odebrán supernatant do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. K supernatantu byl přidán 1 ml 70% ethanolu, směs byla promíchána (*Minishaher IKA, Německo*) po dobu 10 sekund a centrifugována (*centrifuga Eppendorf 5415R, 12 000 x g, úhlový rotor*) 5 minut při 4°C. Nakonec byl supernatant odebrán do další 1,5 ml mikrozkušavky a opět centrifugován (*centrifuga Eppendorf 5415R, 12 000 x g, úhlový rotor*). Odstředěná RNA byla rozpuštěna v 80 µl „RNase free“ vody, směs byla promíchána (*Minishaher IKA, Německo*) po dobu 10 sekund a takto byla inkubována po 15 minut při 55-60°C. Každý vzorek byl pipetován do 3 mikrozkušavek po 200 µl (aliquoty pro stanovení exprese izolované potkaní mRNA), do 1 mikrozkušavky po 1 500 µl (stanovení čistoty a koncentrace izolované potkaní mRNA) a uskladněn při -80°C. Dále byla izolována mRNA z

potkaních ledvin obdobným způsobem s tím rozdílem, že byla vynechána první centrifugace a peleta byla rozpuštěna ve 40 µl „RNase free“, vody.

### 3.2.3. UV-VIS spektrofotometrie mRNA izolované z jater a ledvin potkana

Čistota a koncentrace RNA byla stanovena UV-VIS spektrofotometrií na přístroji Carry 300 spectrophotometer (*Varian, USA*), a to tak že byla proměřena UV-VIS spektra vzorků mRNA izolovaných z jater a ledvin potkanů a vypočítána koncentrace daných vzorků.

### 3.2.4. Synthesa cDNA z mRNA izolované z jater a ledvin potkana

Složení „MasterMixu“ (*Applied Biosystems, USA*):

množství odpovídající jedné inkubační směsi

1. 4,2 µl „RNase free“ vody
2. 2 µl 10x ředěného pufru RT (*Reverse Transcription*)
3. 2 µl 10x ředěných „náhodných“ primerů
4. 0,8 µl 25x ředěné směsi dNTP (*deoxyribonukleotidtrifosfát*, 100 mM)
5. 1 µl inhibitoru RNasy

Složení inkubační směsi (Applied Biosystems, USA):

1. 1 µg RNA
2. „RNase free“ voda v množství uvedeném v Tab. 3
3. 10 µl „MasterMixu“
4. 1 µl MultiScribe™ reversní transkriptasy (50 U/µl)

**Tab. 3: Koncentrace izolované potkaní mRNA, objemy izolované potkaní mRNA a objemy „RNase free“ vody v příslušných inkubačních směsích.**

*AAI – mRNA izolovaná z jater resp. ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou I, AAI – mRNA izolovaná z jater resp. ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou II, AAmix – mRNA izolovaná z jater resp. ledvin potkana premedikovaného směsí aristolochových kyselin, K – mRNA izolovaná z jater resp. ledvin potkana nepremedikovaného žádnou z výše uvedených látek. mRNA izolovaná z jater a ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI resp. potkanů nepremedikovaných byla rozdělena do mikrozkušavek po dvou vzorcích mRNA (aliquoty K1-K2) a do mikrozkušavek po třech vzorcích mRNA (aliquoty AAI1-AAI3, AAI1-AAI3, AAmix1-AAmix3).*

JÁTRA			
Vzorek	Cneředená [mg/ml]	VRNA [µl]	VH <sub>2</sub> O [µl]
K1	1,26	0,79	9,21
K2	2,00	0,50	9,50
AAI1	2,85	0,35	9,65
AAI2	2,87	0,35	9,65
AAI3	2,99	0,33	9,67
AAI1	2,57	0,39	9,61
AAI3	2,32	0,43	9,57
AAmix1	2,24	0,45	9,55
AAmix2	2,40	0,42	9,58
AAmix3	2,30	0,43	9,57

LEDVINY			
Vzorek	Cneředená [mg/ml]	VRNA [µl]	VH <sub>2</sub> O [µl]
K1	0,91	1,10	8,90
K2	3,45	0,29	9,71
AAI1	5,10	0,20	9,80
AAI2	4,51	0,22	9,78
AAI3	3,89	0,26	9,74
AAI1	3,28	0,30	9,70
AAI2	4,08	0,24	9,76
AAI3	4,87	0,21	9,79
AAmix1	1,91	0,52	9,48
AAmix2	4,11	0,24	9,76
AAmix3	3,15	0,32	9,68

cDNA byla syntetisována za užití „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu“ (*Applied Biosystems, USA*) postupem uvedeným výrobcem. Použité pomůcky byly sterilisovány a chemikálie a vzorky byly po dobu experimentu ponechány na ledu. Nejprve byl připraven „MasterMix“ (*Applied Biosystems, USA*), jehož jednotlivé složky byly pipetovány v takovém množství a pořadí jak je zmíněno výše. „MasterMix“ byl promíchán a „stočen“ (*Minicentrifuga Spectrafuge, úhlový rotor*). Isolovaná potkaní mRNA byla rozmrazena a následně byla promíchána a „stočena“ (*Minicentrifuga Spectrafuge, úhlový rotor*). Dále byly připraveny inkubační směsi, jejíž jednotlivé složky byly pipetovány v takovém množství a pořadí jak je uvedeno výše. Nejprve byla pipetována „RNase free“ voda (viz Tab. 3, str. 44) a poté po 1 µg příslušného vzorku izolované potkaní mRNA. Takto připravené roztoky byly promíchány a opět „stočeny“ (*Minicentrifuga Spectrafuge, úhlový rotor*). Poté bylo do odstředěných směsí přidáno po 10 µl „MasterMixu“ (viz kapitola 3.2.4.). Směs byla znovu promíchána a „stočena“ (*Minicentrifuga Spectrafuge, úhlový rotor*). Z každého vzorku byly do 200 µl mikrozkupek odebrány 2 µl, které sloužily jako negativní kontrola. Nakonec bylo ke zbylým 18 µl od každého vzorku pipetováno po 1 µl reversní transkriptasy (50 U/µl, *Applied Biosystems, USA*). Směsi byly promíchány, „stočeny“ (*Minicentrifuga Spectrafuge, úhlový rotor*) a umístěny do thermocykleru (*BioRad, USA*). Synthesa cDNA probíhala na thermocykleru za následujících podmínek: 10 minut při 25°C „nasedání“ náhodných hexamerů, 120 minut při 37°C prodlužování řetězce cDNA, 5 minut při 85°C inaktivace reversní transkriptázy, ochlazení na 4°C. Produkty byly uchovány při -80°C pro následující experimenty.

### 3.2.5. Stanovení exprese mRNA analysovaných enzymů

Exprese mRNA analysovaných enzymů byla stanovena za použití metody RT-PCR (*Real time polymerase chain reaction*). Hladiny exprese mRNA enzymů CYP1A a CYP2C byly měřeny RNDr. Helenou Dračínskou, Ph.D. V rámci bakalářské práce byla získaná data vyhodnocena a dále byla stanovena hladina exprese mRNA enzymu POR.

Složení inkubačních směsí (*Applied Biosystems, USA; Roche Diagnostics, Německo*):

1. 4 µl „RNase free“ vody
2. 1 µl TaqMan Gene Expression Assay Mix
3. 10 µl FastStart Essential DNA Probes Master
4. 5 µl cDNA (10x ředěná) připravená postupem popsaným v kapitole 3.3.4.

Použité pomůcky byly sterilisovány a chemikálie a vzorky byly po dobu experimentu ponechány na ledu. Nejprve byla připravená cDNA 10x ředěna „Milli-Q“ ultračistou vodou. Do mikrozkušavek byly pipetovány příslušné složky inkubační směsi v takovém množství a v takovém pořadí jak je uvedeno výše. Obdobně byl připraven vzorek „blank“, kde bylo namísto cDNA přidáno 5 µl vody. Vzorky byly analysovány na přístroji RotorGene 2000 (*Corbett Research, Austrálie*) za následujících podmínek: inkubace 2 minuty při 50°C a počáteční denaturace po 10 minut při 95°C, 50 cyklů denaturace po 15 sekund při 95°C a „nasedání“ primerů po 1 minutu při 60°C, elongace 30 sekund při 72°C, fluorescence 7. Hodnoty, ve kterých byl zaznamenán významný nárůst fluorescenčního signálu (cycle threshold), byly měřeny pro každý vzorek cílového genu, stejně tak jako pro

každý vzorek srovnávacího genu ( $\beta$ -aktin). Dále bylo vyhodnoceno  $\Delta\Delta c_T$  dle následujících rovnic:  $\Delta c_T = c_T(\text{cílový gen}) - c_T(\beta\text{-aktin})$ ,  $\Delta\Delta c_T = \Delta c_T(\text{vzorek}) - \Delta c_T(\text{kontrola})$ , kde  $\Delta c_T(\text{vzorek})$  odpovídá  $\Delta c_T$  izolované mRNA z jaterní a ledvinné tkáně potkanů premedikovaných AAI, AAI resp. AAmix a  $\Delta c_T(\text{kontrola})$  odpovídá  $\Delta c_T$  izolované mRNA z jaterní a ledvinné tkáně potkanů nepremedikované žádnou z výše zmíněných látek. Hodnoty  $\Delta c_T$  byly pozitivní, pokud byl cílový gen exprimován slaběji než  $\beta$ -aktin, naopak bylo  $\Delta c_T$  negativní, pokud byl cílový gen exprimován silněji než  $\beta$ -aktin. Indukce exprimované mRNA byla vyhodnocena jako  $2^{-\Delta\Delta c_T}$ , kde hodnota  $2^{-\Delta\Delta c_T}(\text{kontrola})$  byla rovna 1. Pak mRNA exprimovaná silněji než kontrola nabývala hodnot větších jak 1 a mRNA exprimovaná slaběji než kontrola nabývala hodnot od 0 do 1.

### 3.2.6. Oxidace AAI potkaními mikrosomy

Oxidace AAI potkaními mikrosomy a metoda RP-HPLC (*Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) byla provedena společně s A. Hudecovou. Tyto metody i výsledky jsou tedy uvedeny i v její bakalářské práci. Oxidace AAI na AAIa potkaními jaterními a ledvinnými mikrosomy *in vitro* byla stanovena v inkubačních směsích připravených postupem popsáným níže, za pomoci sledování množství AAIa metodou RP-HPLC. Stanovení bylo provedeno v tripletech o celkovém objemu inkubační směsi 500  $\mu\text{l}$ .

#### Složení inkubační směsi:

1. fosfátový pufr (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), pH 7,4
2. potkaní jaterní mikrosomy,  $c_{\text{proteinů}} = 0,5 \text{ mg/ml}$
3. 10  $\mu\text{M}$  AAI rozpuštěná v destilované vodě
4. NADPH-GS: 1 mM  $\text{NADP}^+$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ , 10 mM glukosa-6-fosfát, 1U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Jednotlivé složky inkubační směsi byly pipetovány v takovém množství a pořadí jak je zmíněno výše. Reakční směs byla nejprve zamíchána a následně inkubována 10 minut za stálého třepání (*Mikroshaker type MI-1, 400 RPM*) při 37°C. Zastavení reakce bylo dosaženo přidáním 1 ml ethylacetátu, načež byla reakční směs 2 minuty třepána (*Mikroshaker type MI-1, 400 RPM*). Směs byla centrifugována 3 minuty (*13 000 RPM, centrifuga 5418 Eppendorf, úhlový rotor*), oddělená organická fáze byla odebrána a k vodné fázi byl znovu přidán 1 ml ethylacetátu. Shodným způsobem byla provedena další extrakce. Extrakty byly přes noc odpařeny v digestoři a uchovány při -20°C. Před vlastní analýsou byly extrakty rozpuštěny v 30 µl methanolu a analysovány metodou RP-HPLC.

### 3.2.7. Vysokotlaká (vysokoúčinná) kapalinová chromatografie AAI a jejího metabolitu

Látky přítomné v extraktech inkubačních směsích obsahujících AAI a její metabolit AAIA byly separovány metodou RP-HPLC. Separace extraktů z inkubačních směsí (*viz kapitola 3.3.6*) proběhla za užití kolony C18 (*Machery-Nagel, SRN*) při teplotě 35°C. Jako mobilní fáze byla použita směs 100 mM triethylaminacetátu (A) (pH 7, úprava pH kyselinou octovou) a 80% acetonitrilu (B). Mobilní fáze byly před vlastní analýsou sonikovány. Standard AAI byl připraven smícháním 28 µl methanolu a 2 µl AAI (10 µM), načež byla směs promíchána. Na kolonu bylo nanášeno 20 µl vzorku. Látky byly separované v gradientovém uspořádání, a to tak, že se složení mobilní fáze měnilo z 80% A a 20% B na 40% A a 60% B. Při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a tlaku 80 bar trvala jedna eluce 55 min. AAI a její metabolit AAIA eluované v retenčním čase 37,2 minut resp. 23,8 minut byly detekovány při vlnové délce 250 nm.



## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Isolace mRNA z jater a ledvin potkana

V průběhu experimentu bylo izolováno celkem 11 vzorků potkaní jaterní mRNA a 11 vzorků potkaní ledvinné mRNA; potkaní jaterní resp. ledvinné mRNA kontrolních zvířat (skupina K1-K2) a potkaní jaterní resp. ledvinné mRNA premedikovaných zvířat (skupina AA1-AA3) (viz Tab. 4). Zmíněné skupiny zvířat byly premedikovány AAI, AAI a jejich směsí, kontrolní potkaní skupina (K) premedikována nebyla. Isolované potkaní jaterní a ledvinné mRNA byly použity pro následující experimenty (viz níže).

*Tab. 4: Jednotlivé vzorky izolované jaterní a ledvinné mRNA použité k následujícím experimentům. AAI – mRNA izolovaná z jater resp. ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou I, AAI – mRNA izolovaná z jater resp. ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou II, AAmix – mRNA izolovaná z jater resp. ledvin potkana premedikovaného směsí aristolochových kyselin, K – mRNA izolovaná z jater resp. ledvin potkana nepremedikovaného žádnou z výše uvedených látek. mRNA izolovaná z jater a ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI resp. potkanů nepremedikovaných byla rozdělena do mikrozkušavek po dvou vzorcích mRNA (vzorky K1-K2) a do mikrozkušavek po třech vzorcích mRNA (vzorky AAI1-AAI3, AAI1-AAI3, AAmix1-AAmix3).*

JÁTRA	K1	K2	AAI 1	AAI 2	AAI 3	AAI 1	AAI 2	AAI 3	AAmix 1	AAmix 2	AAmix 3
LEDVINY	K1	K2	AAI 1	AAI 2	AAI 3	AAI 1	AAI 2	AAI 3	AAmix 1	AAmix 2	AAmix 3

## 4.2. UV-VIS spektrofotometrie a synthesisa cDNA z mRNA izolované z jater a ledvin potkana

UV-VIS spektra vzorků mRNA byla měřena na přístroji Carry 300 spectrophotometer (*Varian, USA*). Tak byla stanovena čistota a koncentrace mRNA izolované z jater a ledvin potkana (*viz. Tab. 5 a Tab. 6, str. 50 a str. 51*). Potkaní jaterní a ledvinné mRNA byly následně využity pro synthesisu cDNA.

*Tab. 5: Koncentrace mRNA izolované z jater potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí, a potkanů nepremedikovaných. Zjištěné absorbance této mRNA při vlnové délce 260 nm (A<sub>260</sub>), 280 nm (A<sub>280</sub>) a 320 nm (A<sub>320</sub>) a její čistota (A), koncentrace ředěné mRNA izolované z potkaních jater v µg/ml (C<sub>ředěná</sub>) a koncentrace původní neředěné mRNA izolované z potkaních jater v mg/ml (C<sub>neředěná</sub>). AAI – mRNA izolovaná z jater potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou I, AAI – mRNA izolovaná z jater potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou II, AAmix – mRNA izolovaná z jater potkana premedikovaného směsí aristolochových kyselin, K – mRNA izolovaná z jater potkana nepremedikovaného žádnou z výše uvedených látek. mRNA izolovaná z jater a ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAI a směsí AAI s AAI resp. potkanů nepremedikovaných byla rozdělena do mikrozkušavek po dvou vzorcích mRNA (vzorky K1-K2) a do mikrozkušavek po třech vzorcích mRNA (vzorky AAI1-AAI3, AAI1-AAI3, AAmix1-AAmix3). Vzorek AAI2 byl z důvodu nedostatečné čistoty vyloučen pro další stanovení.*

KONCENTRACE mRNA V JÁTRECH						
Vzorek	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>320</sub>	A	C <sub>ředěná</sub> [µg/ml]	C <sub>neředěná</sub> [mg/ml]
K1	0,706	0,451	0,076	1,680	25,20	1,26
K2	1,055	0,616	0,053	1,780	40,08	2,00
AAI1	1,421	0,813	-0,006	1,742	57,08	2,85
AAI2	1,494	0,884	0,059	1,739	57,40	2,87
AAI3	1,564	0,920	0,067	1,755	59,88	2,99
AAI1	1,323	0,707	0,037	1,919	51,44	2,57
AAI2	0,012	0,027	0,029	8,5	-0,68	-0,034
AAI3	1,237	0,773	0,079	1,669	46,32	2,32
AAmix1	1,300	0,823	0,180	1,742	44,80	2,24
AAmix2	1,343	0,845	0,145	1,711	47,92	2,40
AAmix3	1,182	0,644	0,030	1,876	46,08	2,30

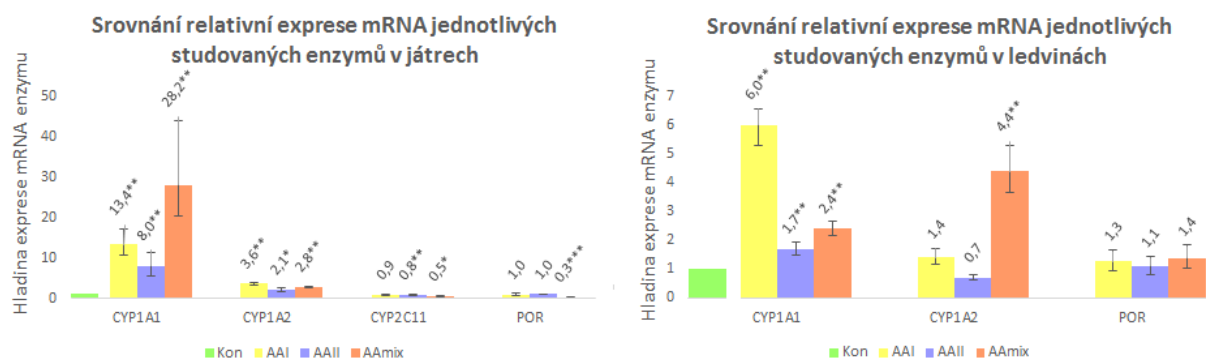
*Tab. 6: Koncentrace mRNA izolované z ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAII a jejich směsi, a potkanů nepremedikovaných. Zjištěné absorbance této mRNA při vlnové délce 260 nm ( $A_{260}$ ), 280 nm ( $A_{280}$ ) a 320 nm ( $A_{320}$ ) a její čistota ( $A$ ), koncentrace ředěné mRNA izolované z potkaních ledvin v  $\mu\text{g/ml}$  ( $c_{\text{ředěná}}$ ) a koncentrace původní neředěné mRNA izolované z potkaních ledvin v  $\text{mg/ml}$  ( $c_{\text{neředěná}}$ ). AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou I, AAII – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou II, AAmix – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného směsí aristolochových kyselin, K – mRNA izolovaná z ledvin potkana nepremedikovaného žádnou z výše uvedených látek. mRNA izolovaná z jater a ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAII a směsí AAI s AAII resp. potkanů nepremedikovaných byla rozdělena do mikrozkušavek po dvou vzorcích mRNA (vzorky K1-K2) a do mikrozkušavek po třech vzorcích mRNA (vzorky AAI1-AAI3, AAI11-AAI13, AAmix1-AAmix3).*

KONCENTRACE mRNA V LEDVINÁCH						
Vzorek	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{320}$	$A$	$c_{\text{ředěná}} [\mu\text{g/ml}]$	$c_{\text{neředěná}} [\text{mg/ml}]$
K1	0,425	0,241	-0,031	1,676	18,24	0,91
K2	1,672	0,909	-0,052	1,794	68,96	3,45
AI1	1,304	0,704	0,029	1,889	51,00	5,10
AI2	1,177	0,669	0,050	1,821	45,08	4,51
AI3	1,009	0,568	0,037	1,831	38,88	3,89
AI11	1,678	0,874	0,037	1,961	65,64	3,28
AAI12	1,074	0,629	0,053	1,773	40,84	4,08
AI13	1,252	0,687	0,034	1,865	48,72	4,87
Amix1	0,908	0,479	-0,045	1,819	38,12	1,91
Amix2	1,067	0,581	0,039	1,897	41,12	4,11
Amix3	0,834	0,476	0,047	1,834	31,48	3,15

### 4.3. Stanovení exprese mRNA enzymů analysovaných enzymů

Jak bylo uvedeno výše, v první části experimentální práce byl zkoumán vliv premedikace potkanů AAI, AAI a jejich směsi na expresi mRNA enzymů CYP1A1, CYP1A2, CYP2C11 a POR v játrech a v ledvinách těchto zvířat.

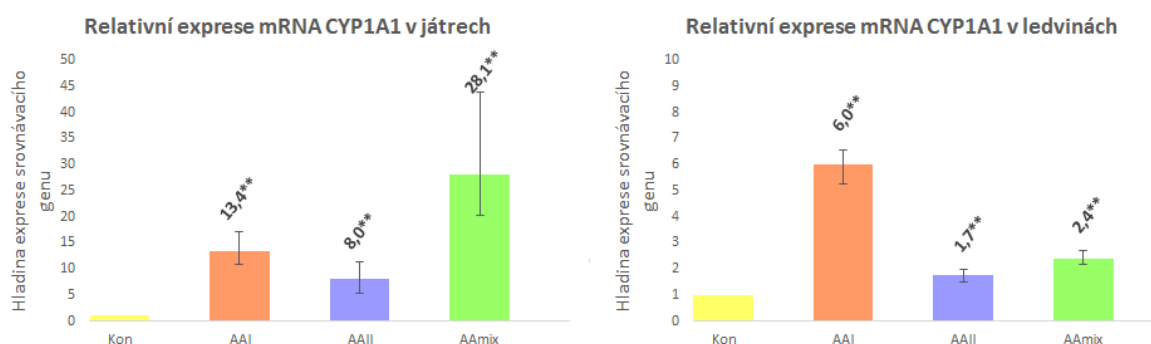
Obecně byly nejvyšší expresní hladiny mRNA sledovaných enzymů zaznamenány v játrech, který je hlavním orgánem biotransformace xenobiotik. Expresi mRNA v ledvinách byla pak sledována proto, že ledviny jsou místem toxického působení aristolochových kyselin, které jsou sledovanými enzymy metabolisovány. Z porovnání expresních hladin jednotlivých sledovaných enzymů vyplývá, že v játrech i v ledvinách potkanů vystavených působení AAI, AAI a jejich směsí, dochází ke zvýšení exprese mRNA enzymu CYP1A1 (viz Obr. 13). Indukována je i exprese jaterní a ledvinné mRNA enzymu CYP1A2, premedikace zvířat výše zmíněnými látkami. CYP2C11 a POR naopak expresi mRNA v játrech potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí potlačují (viz Obr. 13).



*Obr. 13: Expres mRNA jednotlivých studovaných enzymů v játrech a v ledvinách potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí, a potkanů nepremedikovaných. AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou I, AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou II, AAmix – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného směsí aristolochových kyselin, Kon – mRNA izolovaná z ledvin potkana nepremedikovaného žádnou z výše uvedených látek. Data v obrázku vyjadřují hladiny exprese vzorků stanovených paralelně ve dvou vzorcích (n=2; pro mRNA izolovanou z jater resp. ledvin potkanů nepremedikovaných a pro mRNA izolovanou z jater potkanů premedikovaných AAI a směsí AAI s AAI) a ve třech vzorcích (n=3; pro zbylé skupiny tj. mRNA izolovanou z jater potkanů premedikovaných AAI a mRNA izolovanou z ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí) stanovené způsobem uvedeným v kapitole 3.2.5. Statisticky vyhodnoceno pomocí programu Rest 2009 (Qiagen, Německo), hodnoty lišící se od kontrolního vzorku (Kon): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Kladná hodnota chybové úsečky byla určena jako  $x_{\max} - \emptyset$ , kde  $x_{\max}$  představuje maximální hodnotu standardní chyby S.E. (Standard Error) a  $\emptyset$  představuje hodnotu indukce exprimované mRNA  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ; záporná hodnota chybové úsečky byla určena jako  $\emptyset - x_{\min}$ , kde  $x_{\min}$  představuje minimální hodnotu S.E.*

K nárůstům exprese mRNA enzymu CYP1A1 dochází jak v játrech, tak v ledvinách potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí (viz *Obr. 14, str. 56*). V játrech byl nejvyšší nárůst exprese mRNA tohoto enzymu zaznamenán ve vzorcích mRNA izolované z potkanů premedikovaných směsí AA, a to s indukcí mRNA cílového genu dosahující téměř 30tinásobku ve srovnání s expresí mRNA cílového genu izolované z potkanů nepremedikovaných (kontrola). Řádově o polovinu nižší indukce mRNA enzymu CYP1A1 byla zjištěna ve tkáních zvířat premedikovaných pouze AAI, méně intenzivněji byla indukována mRNA ve tkáních potkanů

vystavených působení AAI. V porovnání s játry premedikovaných zvířat, jsou expresní hladiny mRNA enzymu CYP1A1 v ledvinách potkanů vystavených působení sledovaných látek (AAI, AAI a jejich směsi) podstatně nižší. Nejsilněji byla exprimována mRNA tohoto enzymu v ledvinách potkanů premedikovaných AAI, avšak hodnoty relativní indukce mRNA cílového genu dosahují pouze 6tinásobku ve srovnání s expresí mRNA cílového genu izolované z potkanů nepremedikovaných (kontrola). Expres mRNA izolované z ledvinné tkáně potkanů premedikovaných AAI resp. směsí AA byla indukována o více jak třetinu méně než mRNA izolovaná z ledvinné tkáně zvířat premedikovaných AAI (viz Obr. 14).

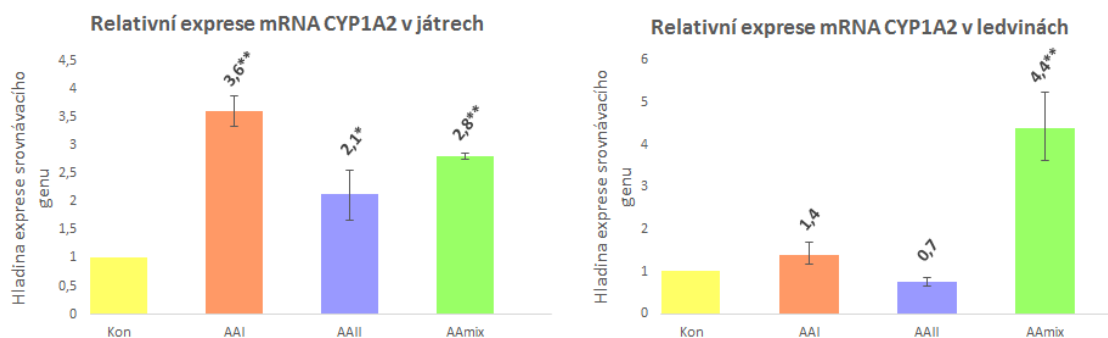


**Obr. 14.: Relativní exprese mRNA CYP1A1 v játrech a v ledvinách potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí, a potkanů nepremedikovaných.** AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou I, AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou II, AAmix – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného směsí aristolochových kyselin, Kon – mRNA izolovaná z ledvin potkana nepremedikovaného žádnou z výše uvedených látek.

*Data v obrázku vyjadřují hladiny exprese stanovené paralelně ve dvou vzorcích ( $n=2$ ; pro mRNA izolovanou z jater resp. ledvin potkanů nepremedikovaných a pro mRNA izolovanou z jater potkanů premedikovaných AAI a směsí AAI s AII) a ve třech vzorcích ( $n=3$ ; pro zbylé skupiny tj. mRNA izolovanou z jater potkanů premedikovaných AAI a mRNA izolovanou z ledvin potkanů premedikovaných AAI, AII a jejich směsí) stanovené způsobem uvedeným v kapitole 3.2.5. Statisticky vyhodnoceno pomocí programu Rest 2009 (Qiagen, Německo), hodnoty lišící se od kontrolního vzorku (Kon):  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ . Kladná hodnota chybové úsečky byla určena jako  $x_{max}-\emptyset$ , kde  $x_{max}$  představuje maximální hodnotu standardní chyby S.E. (Standard Error) a  $\emptyset$  představuje hodnotu indukce exprimované mRNA  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ; záporná hodnota chybové úsečky byla určena jako  $\emptyset-x_{min}$ , kde  $x_{min}$  představuje minimální hodnotu S.E.*

Indukce mRNA enzymu CYP1A2 působením premedikace potkanů AAI, AII a jejich směsí dosahovala podobných hodnot v játrech i v ledvinách. V játrech byla exprese mRNA enzymu CYP1A2 ve tkáních zvířat premedikovaných jak AAI, AII, tak jejich směsí zvýšena. V jaterní tkáni byly zjištěny nejvyšší expresní hladiny mRNA tohoto enzymu ve vzorcích tkáně zvířat vystavených působení samotné AAI, kde byla vypočtena hodnota indukce na 3,6násobek ve srovnání s expresí mRNA cílového genu v potkanech nepremedikovaných (kontrola); hladiny exprese mRNA tohoto enzymu v tkáních zvířat premedikovaných AII a směsí AA, dosahovaly hodnot relativní indukce pohybující mezi 2násobkem a 3násobkem. Oproti tomu expresní hladiny mRNA enzymu CYP1A2 v ledvinách potkanů premedikovaných směsí aristolochových kyselin s maximální indukcí vyšší jak 5násobek ve srovnání s kontrolou vykazovaly významný rozdíl oproti expresním hladinám mRNA v ledvinách potkanů premedikovaných AAI. Zajímavým zjištěním byl fakt, že při premedikaci zvířat aristolochovou kyselinou II byla exprese mRNA enzymu CYP1A2 potlačena (viz Obr. 15, str. 56).

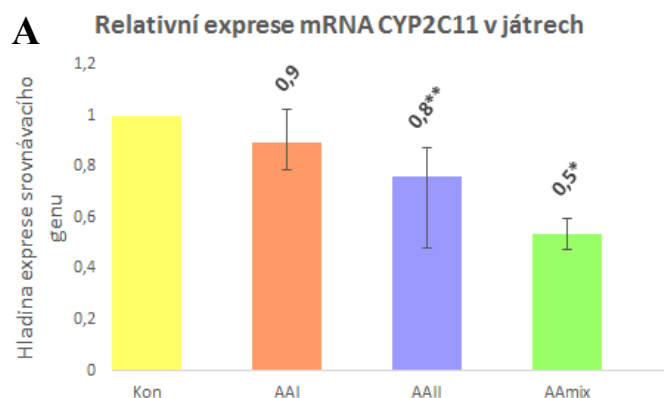


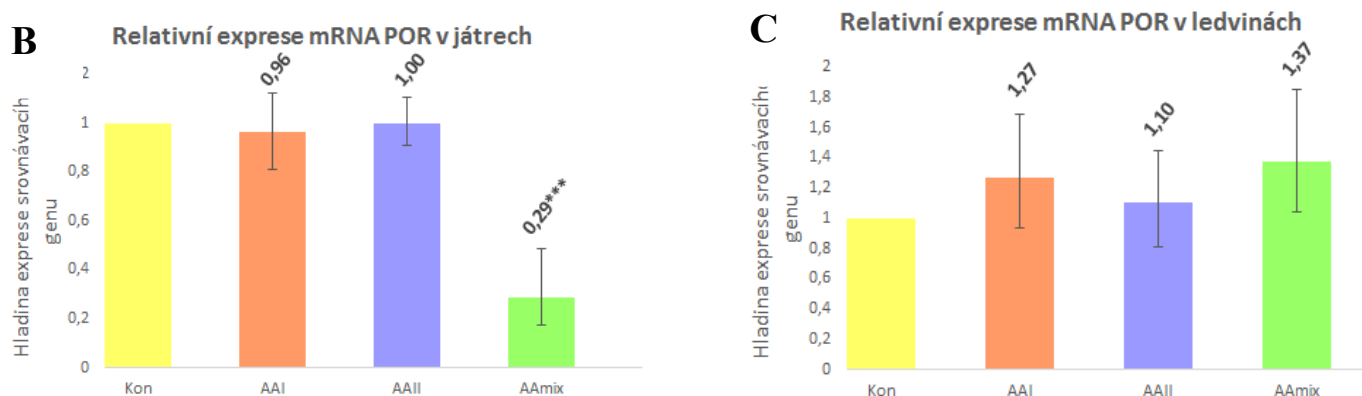


**Obr. 15: Relativní exprese mRNA CYP1A2 v játrech a v ledvinách potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí, a potkanů nepremedikovaných.** AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou I, AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou II, AAmix – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného směsí aristolochových kyselin, Kon – mRNA izolovaná z ledvin potkana nepremedikovaného žádnou z výše uvedených látek. Data v obrázku vyjadřují hladiny exprese stanovené paralelně ve dvou vzorcích ( $n=2$ ; pro mRNA izolovanou z jater resp. ledvin potkanů nepremedikovaných a pro mRNA izolovanou z jater potkanů premedikovaných AAI a směsí AAI s AAI) a ve třech vzorcích ( $n=3$ ; pro zbylé skupiny tj. mRNA izolovanou z jater potkanů premedikovaných AAI a mRNA izolovanou z ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí) stanovené způsobem uvedeným v kapitole 3.2.5. Statisticky vyhodnoceno pomocí programu Rest 2009 (Qiagen, Německo), hodnoty lišící se od kontrolního vzorku (Kon): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Kladná hodnota chybové úsečky byla určena jako  $x_{max}-\emptyset$ , kde  $x_{max}$  představuje maximální hodnotu standardní chyby S.E. (Standard Error) a  $\emptyset$  představuje hodnotu indukce exprimované mRNA  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ; záporná hodnota chybové úsečky byla určena jako  $\emptyset-x_{min}$ , kde  $x_{min}$  představuje minimální hodnotu S.E.

Vedle CYP1A1/2 se na metabolismu AA podílejí i cytochromy P450 podrodiny CYP2C a dále též POR. V první části experimentální práce byl tedy kromě vlivu AAI, AAI a AAI s AAI na expresi mRNA cytochromů P450 podrodiny CYP1A studován i vliv těchto látek na expresi mRNA enzymu CYP2C11 a POR. Při premedikaci potkanů AAI, AAI a jejich směsi došlo v játrech ve všech zmíněných případech k snížení exprese mRNA enzymu CYP2C11. V jaterních tkáních potkanů vystavených působení AAI byla expresní hladina mRNA tohoto enzymu snížena na 0,9násobek, v játrech potkanů premedikovaných AAI bylo zjištěno snížení expresní hladiny mRNA enzymu CYP2C11 na 0,8násobek, zatímco při premedikaci zvířat směsí aristolochových kyselin byla zaznamenáno snížení exprese mRNA enzymu CYP2C11 až na polovinu (*viz Obr. 16*).

Dále byla studována exprese mRNA enzymu POR, a to opět ve tkáních zvířat vystavených působení AAI, AAI a AAI s AAI. V játrech potkanů premedikovaných AAI resp. AAI nebyl zaznamenán nárůst exprese mRNA tohoto enzymu. Naopak při premedikaci potkanů směsí aristolochových kyselin bylo v játrech zaznamenáno snížení exprese mRNA enzymu POR až na 0,3násobek. V ledvinách potkanů vystavených působení AAI, AAI a jejich směsi byl zjištěn mírný nárůst exprese mRNA enzymu POR ve všech výše uvedených případech premedikace (*viz Obr. 16*).

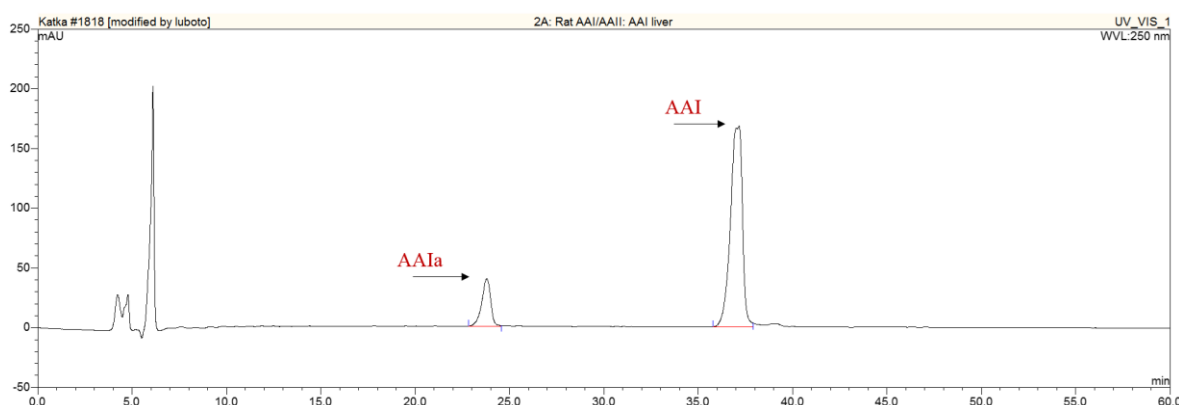




**Obr. 16: Relativní exprese mRNA CYP2C11 (A) a relativní exprese mRNA POR v játrech (B) a v ledvinách (C) potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí, a potkanů nepremedikovaných.** AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou I, AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou II, AAmix – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného směsí aristolochových kyselin, Kon – mRNA izolovaná z ledvin potkana nepremedikovaného žádnou z výše uvedených látek. Data v obrázku vyjadřují hladiny exprese stanovené paralelně ve dvou vzorcích ( $n=2$ ; pro mRNA izolovanou z jater resp. ledvin potkanů nepremedikovaných a pro mRNA izolovanou z jater potkanů premedikovaných AAI a směsí AAI s AAI) a ve třech vzorcích ( $n=3$ ; pro zbylé skupiny tj. mRNA izolovanou z jater potkanů premedikovaných AAI a mRNA izolovanou z ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí) stanovené způsobem uvedeným v kapitole 3.2.5. Statisticky vyhodnoceno pomocí programu Rest 2009 (Qiagen, Německo), hodnoty lišící se od kontrolního vzorku (Kon): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Kladná hodnota chybové úsečky byla určena jako  $x_{max} - \emptyset$ , kde  $x_{max}$  představuje maximální hodnotu standardní chyby S.E. (Standard Error) a  $\emptyset$  představuje hodnotu indukce exprimované mRNA  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ; záporná hodnota chybové úsečky byla určena jako  $\emptyset - x_{min}$ , kde  $x_{min}$  představuje minimální hodnotu S.E.

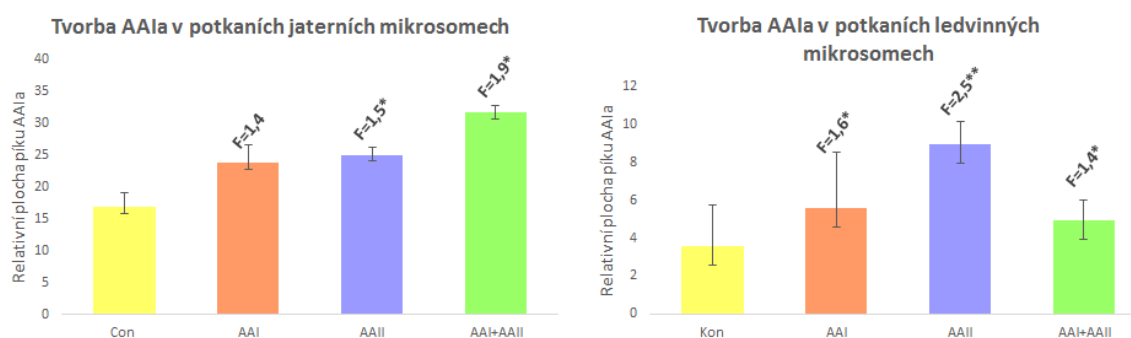
#### 4.4. Oxidace AAI potkaními mikrosomy a vysokotlaká (vysokoúčinná) kapalinová chromatografie AAI a jejího metabolitu

Druhá část experimentů prováděných v rámci práce byla uskutečněna společně s A. Hudecovou. Výsledky těchto experimentů jsou tedy uvedeny jak v této práci, tak v práci A. Hudecové. Studován byl oxidační metabolismus AAI. Jak již bylo uvedeno, AAI je oxidačně detoxifikována na demethylovaný produkt AAIA. K analýze tvorby AAIA byly použity jaterní a ledvinné mikrosomy izolované z potkanů premedikovaných AAI, AAIa a jejich směsí, jako kontrola byly užity mikrosomy izolované z potkanů, kteří nebyli vystaveni žádné ze zmíněných látek. AAI a její detoxifikační metabolit AAIA byly separovány pomocí metody RP-HPLC a detekovány při vlnové délce 250 nm (viz Obr. 17).



**Obr. 17: Chromatogram znázorňující eluci AAI a jejího oxidačního metabolitu AAIA tvořeného mikrosomy izolovanými z jater potkana premedikovaného AAI. Při vlnové délce 250 nm byly zjištěny „peaky“ s retenčním časem eluce AAI a jejího metabolitu AAIA. AAI byla eluována v retenčním čase 37,2 minut a metabolit AAIA v retenčním čase 23,8 minut.**

Potkaní jaterní mikrosomy oxidují AAI na AAIA třikrát efektivněji než mikrosomy ledvinné. Nejvíce AAIA bylo tvořeno jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných směsí AAI a AAI, přibližně stejné množství AAIA vznikalo v jaterních mikrosomech potkanů vystavených působení pouze AAI resp. AAI. V potkaních ledvinných mikrosomech bylo největší množství vzniklé AAIA zaznamenáno při premedikaci zvířat aristolochovou kyselinou II. Zhruba stejné množství AAIA bylo tvořeno ledvinnými mikrosomy potkanů premedikovaných AAI resp. směsí AAI s AAI (viz Obr. 18).



**Obr. 18: Tvorba metabolitu AAI – aristolochové kyseliny Ia v jaterních a ledvinných mikrosomech potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí, a potkanů nepremedikovaných.** AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou I, AAI – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného aristolochovou kyselinou II, AAmix – mRNA izolovaná z ledvin potkana premedikovaného směsí aristolochových kyselin, Kon – mRNA izolovaná z ledvin potkana nepremedikovaného žádnou z výše uvedených látek. Data uvedená v obrázku jsou průměrem ( $\pm$ SD) tří stanovení. Statisticky vyhodnoceno za užití t-testu. Hodnoty jsou průměrem ze tří stanovení lišící se od kontrolního vzorku (Kon): \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , F představuje násobek zvýšení množství AAIA oproti kontrole.

## 5. Závěr

V úvodní části bakalářské práce byly shromážděny informace o aristolochových kyselinách a nemocemi s nimi spojenými - nefropatií vyvolanou aristolochovými kyselinami (AAN) a Balkánskou endemickou nefropatií (BEN). Popsán byl rovněž metabolismus aristolochových kyselin a enzymy, které se na něm podílejí.

V první části experimentů prováděných v rámci bakalářské práce byl studován vliv AAI, AAI a jejich směsi na expresi enzymů participujících na metabolismu aristolochových kyselin, a to na transkripční úrovni. V experimentech byla izolována mRNA z jater a ledvin potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí a potkanů nepremedikovaných žádnou z výše zmíněných látek. Ke stanovení vlivu premedikace zvířat sledovanými látkami (AAI, AAI a AAI s AAI) na expresi mRNA potkaních jater a ledvin analysovaných enzymů CYP1A1, CYP1A2, CYP2C11 a POR byla užita metoda RT-PCR. Zjištěno bylo, že v jaterních a ledvinných tkáních potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí dochází k ovlivnění exprese mRNA studovaných enzymů. V játrech a ledvinách zvířat vystavených působení sledovaných látek byla ve většině případů zaznamenána indukce mRNA enzymů CYP1A1 a CYP1A2. Naproti tomu, v jaterní tkáni potkanů premedikovaných sledovanými látkami došlo ke snížení exprese mRNA enzymů CYP2C11 a POR.

V druhé části experimentální práce byl studován vliv působení enzymů na oxidační metabolismus AAI v jaterních a ledvinných mikrosomech izolovaných z potkanů premedikovaných AAI, AAI a jejich směsí. Za působení enzymů potkaních jaterních a ledvinných mikrosomů izolovaných ze zvířat premedikovaných sledovanými látkami byla AAI oxidována na AAIa. Pomocí metody RP-HPLC byla detekována jak AAI, tak její detoxifikační metabolit AAIa a vzniklé množství AAIa bylo kvantifikováno. Zjištěno bylo, že potkaní jaterní mikrosomy oxidují AAI na

AAIa efektivněji než potkaní ledvinné mikrosomy, přičemž největší množství AAIa bylo tvořeno jaterními mikrosomy izolovanými z potkanů vystavených působení směsi AAI a AAIL.

## Seznam použité literatury

<sup>1</sup><http://www.theplantlist.org/1.1/browse/a/aristolochiaceae/>, citováno 2.3. 2017

<sup>2</sup> <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id3186/>, citováno 2.3. 2017

<sup>3</sup> Hutchinson J.: *The families of flowering plants*, Clarendon press, Oxford, (1973)

<sup>4</sup> Liu T.S, Lai M.J.: *Flora of Taiwan*, NTU, Taipei, (1976)

<sup>5</sup> Novák J., Skalický M.: *Botanika, cytologie, histologie, organologie a systematika*, powerprint, Praha, (2009)

<sup>6</sup> International agency for research on cancer, Plants containing Aristolochic acids, *IARC monogr., Pharmaceuticals*, **100**(A), (2012)

<sup>7</sup> EMEA, Working party on herbal medicinal products, *Paper on the risks associated with the use of herbal products containing Aristolochia species*, (2000)

<sup>8</sup> International agency for research on cancer, *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*, *IARC monogr. Eval. carcinog. risks hum.*, **82**, (2002)

<sup>9</sup> Kumar V., Ponam D., Prasad A.K., Parmar V.S., *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 565-583, (2003)

<sup>10</sup> Bieler C.A., Stiborova M., Wiessler M., Cosyns J.P., van Ypersele de Strihou C., Schmeiser H.H., 32P-Post-Labeling analysis of DNA adducts formed by Aristolochic acid in tissues from patients with Chinese herbs nephropathy, *Carcinogenesis*, **18**, 1063-1067, (1997)

<sup>11</sup> Artl V.M., Stiborová M., Schmeiser H.H., Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: *Mutagenesis*, **17**, 265-277, (2002)

<sup>12</sup> Jackson L., Kofman S., Weiss A., Brodovsky H., Aristolochic acid phase-I clinical Study, *Cancer Chemother. Rep.*, **42**, 35-37, (1964)

<sup>13</sup> Nitzsche D., Melzig M.F., Artl V.M., Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of Aristolochic acid I - a component of Aristolochiaceae plant extracts used in homeopathy, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **35**, 325-334, (2013)



- 
- <sup>14</sup> Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastre R., But P., Vanherweghem J.L., Identification of Aristolochic acid in chinese herbs. *Lancet*, **343**, 174, (1994)
- <sup>15</sup> Vanherweghem J.L., Depierreux M., Tielemans C., Abramowicz D., Dratwa M., Jadoul M., Richard C., Vandervelde D., Verbeelen D., Vanhaelen-Fastre R., Vanhaelen M., Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including chinese herbs, *Lancet*, **341**, 387-391, (1993)
- <sup>16</sup> Cosyns J.P., Jadoul M., Squifflet J.P., De Plaen J.F., Ferluga, D., van Ypersele de Strihou C., Chinese herbs nephropathy: A clue to Balkan endemic nephropathy?, *Kidney Int.*, **45**, 1680-1688, (1994)
- <sup>17</sup> Vanherweghem J.L., A new form of nephropathy secondary to the absorption of chinese herbs, *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.*, **149**, 128-135, (1994)
- <sup>18</sup> Vanherweghem J.L., Misuse of herbal remedies: The case of an outbreak of terminal renal failure in Belgium (Chinese herbs nephropathy), *J. Altern. Complement. Med.*, **4**, 9-13, (1998)
- <sup>19</sup> Yang C.S., Lin C.H., Chang S.H., Hsu H.C., Rapidly progressive fibrosing interstitial nephritis associated with chinese herbal drugs, *Kidney Dis.*, **35**, 313-318, (2000)
- <sup>20</sup> Nortier J.L., Vanherweghem J.L., Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a chinese herb (*Aristolochia fangchi*), *Toxicology*, **181-182**, 577-580, (2002)
- <sup>21</sup> Schmeiser H.H., Bieler C.A., Wiessler M., van Ypersele de Strihou C., Cosyns J.P., Detection of DNA adducts formed by Aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy, *Cancer Res.*, **56**, 2025-2080, (1996)
- <sup>22</sup> Pfau W., Schmeiser H.H., Wiessler M., Aristolochic acid binds covalently to the exocyclic amino group of purine nucleotides in DNA, *Carcinogenesis*, **11**, 313-319, 1990
- <sup>23</sup> Tanchev Y., Evstatiev Z.V., Dorosiev G., Pencheva Z.H., Zvetkov G., Study on nephritis in the region of Vratza (in Bulgarian), *Savr. Med.*, **7**, 14-29, (1956)
- <sup>24</sup> Danilovic V., Djuriscic M., Mokranjac M., Stojimirovic B., Zivojinovic J., Stojakovic J., Chronic nephritis due to lead poisoning by digestive foute (flour), *Presse Med.*, **65**, 2039-2040, (1957)

- 
- <sup>25</sup> Bamias, G., Boletis, J., Balkan nephropathy: Evolution of our knowledge. *Am. J. Kidney Dis.* **52**, 606-616, (2008)
- <sup>26</sup> Pavlović N.M., Review Balkan endemic nephropathy-current status and future perspectives, *Clin. Kidney J.*, **6**, 257-265, (2013)
- <sup>27</sup> Bamias G., Boletis J., Am J., Review Balkan nephropathy: evolution of our knowledge, *Kidney Dis.*, **52**, 606-616, (2008)
- <sup>28</sup> Polenakovic M., Stefanovic V.: *Textbook of clinical nephrology*, Oxford university press, Oxford, (1992)
- <sup>29</sup> Stefanovic V., Cukuranovic R., Miljkovic S., Marinkovic D., Toncheva D., Fifty years of Balkan endemic nephropathy: Challenges of study using epidemiological method, *Ren. Fail.*, **31**, 409-418, (2009)
- <sup>30</sup> Pavlović N.M., Balkan endemic nephropathy-current status and future perspectives, *Clin Kidney J.*, **6**, 257-265, (2013)
- <sup>31</sup> Basic-Jukic N., Hrsak-Puljic I., Kes P., Bubic-Filipi L., Pasini J., Hudolin T., Kastelan Z., Reiner Z., Kordic M., Brunetta B., Juric I., Renal transplantation in patients with Balkan endemic nephropathy, *Transplant Proc.*, **39**, 1432-1435, (2007)
- <sup>32</sup> Stefanovic V., Jelakovic B., Cukuranovic R., Bukvic D., Nikolic J., Lukic L., Gluhovschi G., Toncheva D., Polenakovic M., Cosyns J.P., Diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy: Proposal by an International panel, *Ren. Fail.*, **29**, 867-880, (2007)
- <sup>33</sup> Pavlovic-Kentera V., Djukanovic L., Clemons G.K., Trbojevic S., Dimkovic N., Slavkovic A., Anemia in Balkan endemic nephropathy, *Kidney Int.*, **40**, 46-48, (1991)
- <sup>34</sup> Pavlovic-Kentera V., Clemons G.K., Trbojevic S., Dimkovic N., Djukanovic L., Erythropoietin and anemia in the progression of Balkan endemic nephropathy, *Nephron*, **42**, 152-155, (1998)
- <sup>35</sup> Stefanović V., Diagnostic: *Criteria current research in Endemic (Balkan) nephropathy*, University press, Nis, (1983)
- <sup>36</sup> Dika Ž., Antoine M.H., Husson C., De Prez E.G., Kos J., Mišić M., Fuček M., Čvorišćec D., Bourgeade M.F., Nortier J.L., Jelaković B., Evaluation of diagnostic criteria for Endemic nephropathy, *Pril*, **35**, 47-50, (2014)

---

<sup>37</sup> Nichifor E., Balea M., Rusu G., Melencu M., Ghiordănescu N., Cristescu I., Dovlete C., Sonoc S., Studies on the familial character of Endemic balkan nephropathy, possible role of the toxic hydric factor in the determination of 'familial agglomerations' in Endemic balkan nephropathy, *Med. Interne.*, **23**, 229-237, (1985)

<sup>38</sup> Markovic B., Lebedev S., Djordjevic M., Arambasic M., Endemic urinary tract cancer in Bulgaria, Yugoslavia, and Romania: etiology and pathogenesis, *Med. Biol. Environ.*, **4**, 1-2, (1976)

<sup>39</sup> Batuman V., Fifty Years of Balkan endemic nephropathy: daunting questions, elusive answers, *Kidney Int.*, **69**, 644-666, (2006)

<sup>40</sup> Stefanovic V., Toncheva D., Polenakovic M., Balkan nephropathy, *Clin. Nephrol.*, **83**, 64-69, (2015)

<sup>41</sup> Pfohl-Leszkowicz A., Chakor K., Creppy E.E., Dirheimer G., DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A, *IARC Sci. Publ.*, **115**, 245-253, (1991)

<sup>42</sup> Schlatter C., Studer-Rohr J., Rásonyi T., Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A, *Food Addit. Contam.*, **13**, 43-44, (1996)

<sup>43</sup> European Food Safety Authority (EFSA), *Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain of the EFSA on a request from the commission related to ochratoxin A in food*, **365**:1-56, (2006)

<sup>44</sup> Tatu C.A., Orem W.H., Finkelman R.B., Feder G.L., The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers, *Environ. Health Perspect.*, **106**, 689-700, (1998)

<sup>45</sup> Voice T.C., McElmurry S.P., Long D.T., Dimitrov P., Ganey V.S., Peptropoulos E.A., Evaluation of the hypothesis that Balkan endemic nephropathy is caused by drinking water exposure to contaminants leaching from pliocene coal deposits, *J Expo Sci Environ Epidemiol.*, **16**, 515-524, (2006)

<sup>46</sup> Ivić M, Lovriæ B. Carcinogenic action of Aristolochia, *Acta Medica Med.*, **5**, 1-3, (1967)

<sup>47</sup> Kazantzis G., Wolstenholme G.E., Knight J., *The Balkan nephropathy*, CIBA foundation, Boston, (1967)

<sup>48</sup> Lord G.M., Hollstein M., Arlt V.M., Roufosse C., Pusey C.D., Cook T., Schmeiser H.H., DNA adducts and p53 mutations in a patient with Aristolochic acid-associated nephropathy., *Am J. Kidney Dis.*, **43**, 11-17, (2004)

---

<sup>49</sup> Schmeiser H.H., Nortier J.L., Singh R., Gamboa Da Costa G., Sennesael J., Cassuto-Viguier E., Ambrosetti D., Rorive S., Pozdzik A., Phillips D.H., Stiborova M., Arlt V.M., Exceptionally long-term persistence of DNA adducts formed by carcinogenic Aristolochic acid I in renal tissue from patients with Aristolochic acid nephropathy, *Int J. Cancer.*, **135**, 502-507, (2014)

<sup>50</sup> Schmeiser H.H., Janssen J.W., Lyons J., Scherf H.R., Pfau W., Buchmann A., Bartram C.R., Wiessler M., Aristolochic acid activates ras genes in rat tumors at deoxyadenosine residues, *Cancer Res.*, **50**, 5464-5469, (1990)

<sup>51</sup> Stiborová M., Bárta F., Levová K., Hodek P., Schmeiser H.H., Arlt V.M., Martínek V., A mechanism of O-demethylation of Aristolochic acid I by cytochromes P450 and their contributions to this reaction in human and rat livers: experimental and theoretical approaches. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 27561-27575, (2015)

<sup>52</sup> Stiborová M., Patočka J., Frei E., Schmeiser H.H.: *Chem. Listy* **99**, 782-788, (2005)

<sup>53</sup> Chan W., Cui L., Xu G., Cai Z., Study of the phase I and phase II metabolism of nephrotoxin Aristolochic acid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 1755-1760, (2006)

<sup>54</sup> Stiborová M., Martínek V., Frei E., Arlt V.M., Schmeiser H.H., Enzymes metabolizing Aristolochic acid and their contribution to the development of Aristolochic acid nephropathy and urothelial cancer., *Curr. Drug. Metab.*, **14**, 695-705, (2013)

<sup>55</sup> Stiborová M., Frei E., Breuer A., Wiessler M., Schmeiser H.H. Evidence for reductive activation of carcinogenic Aristolochic acids by prostaglandin H synthase - 32P-postlabeling analysis of DNA adduct formation, *Mutat. Res.*, **493**, 149-160, (2001)

<sup>56</sup> Stiborová M., Frei E., Hodek P., Wiessler M., Schmeiser H.H. . Human hepatic and renal microsomes, cytochromes P450 1A1/2, NADPH:cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthase mediate the formation of Aristolochic acid-DNA adducts found in atients with urothelial cancer, *Int. J. Cancer*, **113**, 189-197, (2005)

- 
- <sup>57</sup> Klingenberg M., Pigments of rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 376-386, (1958)
- <sup>58</sup> Garfinkel D., Studies on pig liver microsomes. I. enzymic and pigment composition of different microsomal fractions, *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 493-509, (1958)
- <sup>59</sup> Levová K., Moserová M., Kotrbová V., Sulc M., Henderson C.J., Wolf C.R., Phillips D.H., Frei E., Schmeiser H.H., Mares J., Arlt V.M., Stiborová M., Role of cytochromes P450 1A1/2 in detoxication and activation of carcinogenic Aristolochic acid I: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null (HRN) mouse model, *Toxicol. Sci.*, **121**, 43-56, (2011)
- <sup>60</sup> Stiborová M., Frei E., Sopko B., Wiessler M., Schmeiser H.H., Carcinogenic Aristolochic acids upon activation by DT-diaphorase form adducts found in DNA of patients with Chinese herbs nephropathy, *Carcinogenesis*, **23**, 617-625, (2002)
- <sup>61</sup> Ernster, L., Navazio, F., Soluble diaphorases in animal tissues, *Acta. Chem. Scand.*, **12**, 595, (1958)
- <sup>62</sup> Ernster L., Estabrook R.W. Pullman M.E.: *Methods in enzymology*, Academic press, Massachusetts, (1967)
- <sup>63</sup> Stiborová M., Frei E., Sopko B., Sopková K., Marková V., Lanková M., Kumstýřová T., Wiessler M., Schmeiser H.H., Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic Aristolochic acid: evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase, *Carcinogenesis*, **24**, 1695-1703, (2003)
- <sup>64</sup> Martinek V., Kubickova B., Arlt V.M., Frei E., Schmeiser H.H., Hudecek J., Stiborova M., Comparison of activation of Aristolochic acid I and II with NADPH:quinone oxidoreductase, sulphotransferases and N-acetyltransferases, *Neuro Endocrinol. Lett.*, **32**, 57-70, (2011)
- <sup>65</sup> Meinl W., Pabel U., Osterloh-Quiroz M., Hengstler J.G., Glatt H., Human sulphotransferases are involved in the activation of Aristolochic acids and are expressed in renal target tissue, *Int J. Cancer*, **118**, 1090-1097, (2006)